

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



**NUEVAS METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS
PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS
MEDIOAMBIENTAL Y AGROALIMENTARIO :
DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
CAPILAR, QUIRAL Y BIDIMENSIONAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Vanesa Guillén Casla

Bajo la dirección de los doctores

M^a Eugenia de León González
Luis Vicente Pérez Arribas

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**NUEVAS METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS
PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS
MEDIOAMBIENTAL Y AGROALIMENTARIO:
DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
CAPILAR, QUIRAL Y BIDIMENSIONAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Vanesa Guillén Casla

Bajo la dirección de los doctores:
M^a Eugenia de León González y Luís Vicente Pérez Arribas

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**NUEVAS METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS
PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS
MEDIOAMBIENTAL Y AGROALIMENTARIO:
DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
CAPILAR, QUIRAL Y BIDIMENSIONAL.**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

VANESA GUILLÉN CASLA

Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Directores:

Dra. M^a Eugenia de León González

Profesora Titular de la U.C.M.

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

Profesor Titular de la U.C.M.

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**NUEVAS METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS
PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS
MEDIOAMBIENTAL Y AGROALIMENTARIO:
DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
CAPILAR, QUIRAL Y BIDIMENSIONAL.**

Directores:

Dra. M^a Eugenia de León González

Profesora Titular de la U.C.M.

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

Profesor Titular de la U.C.M.

VANESA GUILLÉN CASLA

Madrid, 2012



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 31
Fax: 91 394 43 29

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

MARIA EUGENIA DE LEÓN GONZÁLEZ Y LUIS VICENTE PÉREZ ARRIBAS,
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado ***“NUEVAS METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL Y AGROALIMENTARIO: DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR, QUIRAL Y BIDIMENSIONAL”***, ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección, constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autora.

Dra. Maria Eugenia de León González

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

MADRID, Marzo 2012

Ha pasado ya mucho tiempo desde que en aquel verano de 2006, Eugenia y yo terminábamos de imprimir en su despacho los documentos de mi beca, para formar parte del grupo de investigación en el que había hecho mi proyecto fin de carrera... Y aunque nunca me había planteado hacer un Doctorado desde el primer momento que encendí "mi cromatógrafo Beckmann" supe que al final lo lograría. Desde aquel día, han sido muchas las personas que han compartido conmigo la ilusión de sacar adelante mi Tesis y es a todas ellas a quien quiero dedicar estas líneas.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Dpto. de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores María Eugenia de León González y Luis Vicente Pérez Arribas, a quienes expreso mi más sincero y cariñoso agradecimiento por su apoyo incondicional, dedicación, paciencia y ayuda prestada en todo momento para mi formación tanto científica como personal. Gracias por vuestra confianza, comprensión y amistad, porque sin vuestro apoyo, tesón y palabras de ánimo cuando las cosas no salían, esto no hubiera sido posible. Gracias por ayudarme y animarme a seguir adelante.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Luis María Polo Díez, Catedrático del Departamento de Química Analítica e investigador principal del grupo de Investigación que me ha visto crecer. Gracias por su colaboración, apoyo, aportación científica, consejos y por haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para desarrollar este trabajo. Asimismo, agradecer a la Dra. María Antonia Palacios Corvillo, Directora del Departamento de Química Analítica, su cariñosa acogida en el mismo durante todos estos años. Quiero agradecer también a la Dra. María Jesús Santos Delgado por sus cariñosas palabras de apoyo y ánimo durante todo este tiempo.

Esta labor de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación aportada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (ref. CTQ2008-05263/BQU) y a

la Comunidad de Madrid (ref. S-0505/AGR/0314). Agradecer a este último organismo también la concesión de un Contrato de Investigador de Apoyo para la realización de mi Tesis Doctoral.

Finalmente, me gustaría agradecer de una forma muy especial la ayuda y el apoyo desinteresado que he recibido durante todo este tiempo de mis compañeros, amigos y familia:

Agradecer a mis compañeras de laboratorio Noelia y Raquel, su apoyo, paciencia, y por compartir conmigo risas, charlas y buenos momentos, por escucharme cuando lo necesitaba, por estar ahí. No tendría espacio para escribir tantas y tantas anécdotas vividas en el día a día y que nos han hecho olvidarnos por algunos momentos de nuestros "pícos". GRACIAS AMIGAS!! Sin vosotras no hubiese sido igual. No quisiera olvidarme de todos aquellos estudiantes que han estado con nosotros en este tiempo, sobretodo de Julio y Juanmí; chicos fue genial compartir con vosotros esos ratitos en los que nos hemos reído tanto!!.

Al resto de compañeras del Departamento: Susana, Estefanía, Zoyne, Amparo, Mabel, Marcos, Silvia, Noemí, Laura, Sonia, Pablo, Sonia, María, Anni, y a mis compañeros de Doctorado Jacobo, Marta y Ana Belén, por compartir alegrías y penas, charlas, desahogos, risas y confidencias en los pasillos y hacer de todo esto, en definitiva, algo más llevadero.

A mi amiga Bea, por estar siempre ahí desde bien pequeñitas!! Por escucharme y entenderme. Ahora que he terminado tendré más tiempo y podremos retomar nuestros buenos ratos. No quisiera olvidarme de mi querido CDP!: María, Mamen, Carlos, Ana, Alejandra, Manu, Vero, Julián, Eva, Clement...por tantos y tantos buenos momentos, risas, anécdotas, etc. Vividas durante nuestra Licenciatura. María, lo he logrado! Por supuesto, agradeceros también a aquellos que habéis estado conmigo en la última etapa: JM e Iván, chicos gracias por acogerme siempre con los brazos abiertos!!

No quiero dejar pasar la oportunidad de acordarme de mis nuevos compañeros de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios: Mamen, Clara, Belén, Magdalena, Elena, Nacho, Jose Miguel, Ricardo, y a mi grupo de "los 13 becarios": Gloria, Pilar, Sara, Alberto, Henar, Rocío, Irene, Pruden, Elena, Ana, Ángela, Luis por su cálida y cariñosa acogida durante los últimos seis meses. Gracias a todos!

Doy las gracias a mi familia: papá, mamá y en especial a mi hermana Tamara por su cariño, comprensión, ayuda y paciencia durante todo este tiempo. Siempre me han enseñado a esforzarme por las cosas en las que creo, a soñar y perseguir mis sueños, a mirar siempre hacia delante a pesar de las dificultades. Ellos son los que me han escuchado cada día hablar de "cosas raras" y me han soportado cuando tenía un mal día o cuando las preocupaciones y obligaciones me impedían mirar más allá!. GRACIAS!!

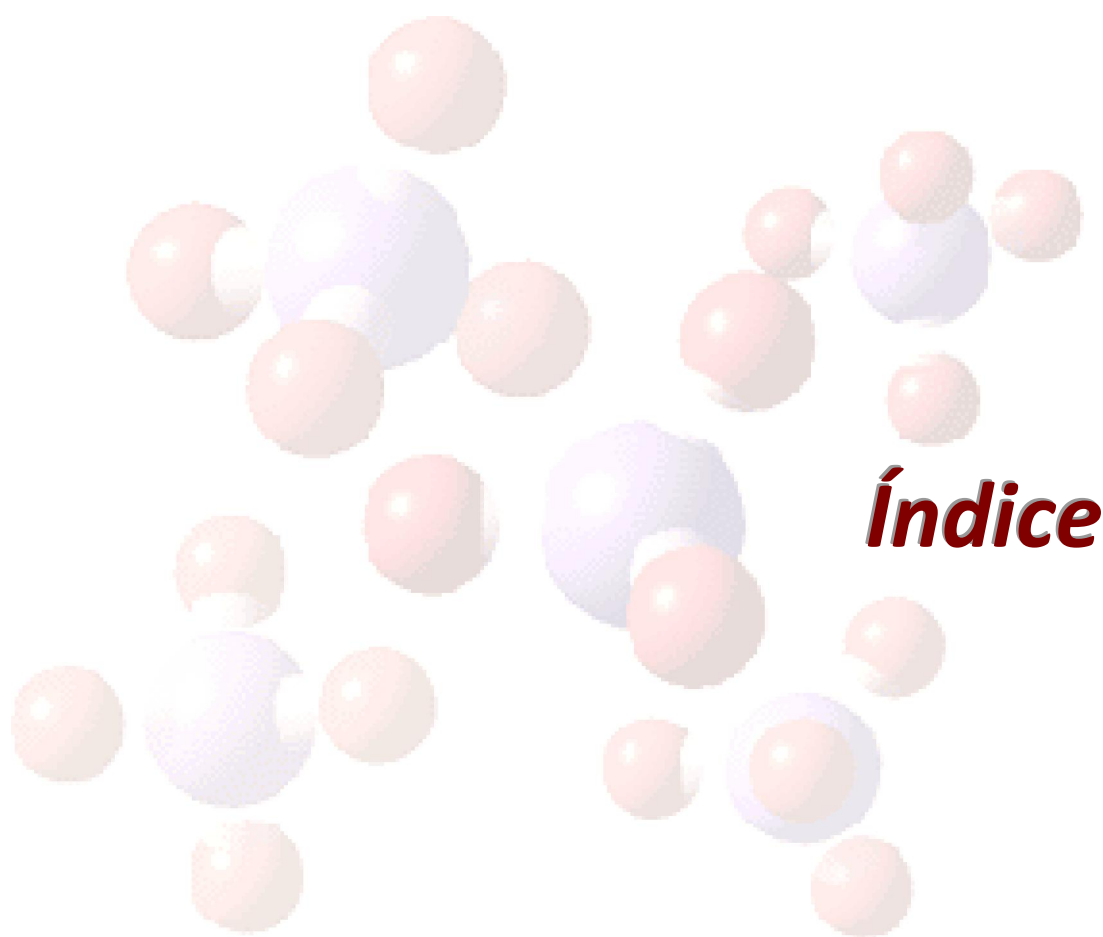
Y no por ser el último, el menos importante agradecerte a ti Jesús por tu confianza, optimismo, ternura, cariño, generosidad y apoyo para seguir adelante. Gracias por ayudarme en mis malos momentos y compartir conmigo los buenos, por soportar con una paciencia extrema estos últimos meses tan duros, por tu apoyo, por tus ánimos, por hacerme mirar hacia delante cuando no tenía fuerzas, por confiar en mí siempre incluso cuando yo no lo hago. GRACIAS POR TODO!

Ya no me queda nada, y dentro de nada podré decir que soy Doctora. Llena de orgullo por todo el esfuerzo y trabajo desempeñado durante estos largos cuatro años, agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible que finalmente lo logre.

Madrid, Marzo de 2012.

A mis padres, María del Pilar y Fernando
A mi hermana Tamara
A mis abuelos: Pilar, Ricardo, Concha y Pepe
Y a ti, Jesús

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no
podrá comprender su tiranía.”
Frankenstein. Mary Shelley*



Índice

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VIII
ANTECEDENTES	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HERBICIDAS	5
2.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE HERBICIDAS	5
2.1.1. Clasificación	6
2.1.2. Dinámica de los herbicidas en el suelo	9
2.2. HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS	11
2.2.1. Introducción.....	11
2.2.2. Presentación y usos.....	13
2.2.3. Propiedades.....	14
2.2.4. Mecanismo de acción y selectividad	17
2.2.5. Interacción con otros herbicidas.....	18
2.2.6. Persistencia y degradación	18
2.2.7. Efectos tóxicos	19
2.2.8. Legislación y control.....	21
3. AMINOÁCIDOS	24
3.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE AMINOÁCIDOS	24
3.1.1. Clasificación	24
3.1.2. Propiedades.....	28
3.1.3. Funciones	33
3.2. AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS.....	37
3.3. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS	40
3.3.1. Métodos de conservación tradicionales	41
3.3.2. Tecnologías emergentes de conservación.....	42
4. QUIRALIDAD	58
4.1. PRINCIPIOS GENERALES	58
4.2. QUIRALIDAD EN HERBICIDAS	59
4.3. QUIRALIDAD EN AMINOÁCIDOS	62
5. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS Y AMINOÁCIDOS	65
5.1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN NO QUIRALES	66
5.1.1. Métodos cromatográficos	66

5.1.1.1. Cromatografía de gases	67
5.1.1.2. Cromatografía de líquidos.....	69
5.1.1.2.A) Acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas	73
5.1.1.2.B) Determinación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante HPLC no quiral.....	80
5.2.2.3.C) Determinación de aminoácidos mediante HPLC no quiral	87
5.1.2 Determinación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos mediante métodos de separación no cromatográficos	96
5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUIRAL	97
5.2.1. Métodos cromatográficos de determinación quiral	99
5.2.1.1. Determinación indirecta	99
5.2.1.2. Determinación directa	102
5.2.1.2.A) Determinación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía quiral directa.....	111
5.2.1.2.B) Determinación de aminoácidos mediante cromatografía quiral directa	118
5.2.2. Métodos de separación quirales no cromatográficos	127
5.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS MULTIDIMENSIONALES.....	128
5.3.1. Acoplamientos cromatográficos LCxLC, LC-LC	130
5.3.2. Acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral	136
6. TRATAMIENTO DE DATOS.....	144
6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.....	144
6.1.1. Análisis de la varianza	144
6.2. EVALUACIÓN QUIMIOMÉTRICA DE LOS DATOS.....	145
6.2.1. Diseño experimental y optimización	145
6.2.2. Análisis de componentes principales.....	148
6.2.3. Análisis de regresión múltiple	150
6.3. APLICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS DE DECONVOLUCIÓN AL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	151
FINALIDAD Y PLANTEAMIENTO	153
PARTE EXPERIMENTAL	156
1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MATERIAL.....	156
1.1. INSTRUMENTACIÓN	156
1.1.1. Equipos de HPLC convencional con detección UV/VIS.....	156

1.1.2. Equipos de separación bidimensional LC aquiral-LC quiral con detección UV/VIS.....	156
1.1.3. Equipo de cromatografía líquida capilar con detección DAD acoplada a espectrometría de masas	158
1.1.4. Otros equipos	159
1.2. REACTIVOS Y MATERIAL.....	161
1.2.1. Material de filtración de muestras y fases móviles	161
1.2.2. Material diverso	162
1.2.3. Software para tratamiento de datos	162
1.2.4. Reactivos y disoluciones.....	163
1.2.5. Muestras	169
2. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS	170
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LOS HERBICIDAS DICLOFOP-ÁCIDO, DICLOFOP-METIL, QUIZALOFOF-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL.....	170
2.1.1. Deconvolución e integración de los picos cromatográficos de los enantiómeros.....	172
2.1.2. Análisis de quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en muestras de suelo.....	172
2.1.3. Optimización de la separación cromatográfica quiral simultánea unidimensional del diclofop-ácido y diclofop-metil.....	175
2.1.4. Análisis simultáneo unidimensional de diclofop-ácido y diclofop-metil en muestras de SIROFOP®	175
2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL MEDIANTE ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL HPLC aquiral-HPLC quiral	176
2.2.1. Optimización de la separación cromatográfica primaria del diclofop-ácido y diclofop-metil.....	176
2.2.2. Optimización del acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral.....	177
2.2.3. Análisis de diclofop-ácido y diclofop-metil en muestras de SIROFOP® mediante LC-LC-UV	179
3. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y COMPUESTOS DERIVADOS	179
3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LA SEROTONINA Y SUS PRECURSORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	179

3.2. DETERMINACIÓN DE SEROTONINA, L-TRIPTÓFANO Y 5-HIDROXI-TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE.....	181
3.2.1. Extracción de la serotonina, L-triptófano y 5-hidroxi-triptófano en muestras de chocolate.....	181
3.2.2. Análisis de serotonina y sus precursores en muestras de chocolate con distinto contenido en cacao.....	182
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO	182
3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO MEDIANTE ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL HPLC aquiral-HPLC quiral.....	183
3.4.1. Optimización de la separación cromatográfica primaria de los aminoácidos	183
3.4.2. Optimización de la separación quiral mediante acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral.....	184
3.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS RTE SOMETIDOS A RADIACIONES IONIZANTES.....	185
3.5.1. Análisis de las transformaciones los aminoácidos en alimentos irradiados mediante LC-LC-UV.....	188
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	189
PARTE I: HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO, DICLOFOP-METIL, QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL MEDIANTE HPLC quiral DIRECTA Y ACOPLAMIENTOS CROMATOGRÁFICOS HPLC quiral-HPLC quiral.....	189
I.1. ENSAYOS PREVIOS.....	189
I.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	195
I.2.1. Características analíticas de los métodos de separación quiral de patrones individuales de herbicidas.....	213
I.3. APLICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS DE DECONVOLUCIÓN EN EL ANÁLISIS QUIRAL DEL QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL.....	218
I.3.1. Selección del modelo matemático	218
I.3.2. Comparación del método de integración de la caída de valle (VDM) y del método matemático de deconvolución mediante la función EMG ...	219

I.3.3. Determinación quiral del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en suelos	224
I.3.3.1. Caracterización del suelo	224
I.3.3.2. Optimización del proceso de extracción	225
I.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA SIMULTANEA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP METIL MEDIANTE HPLC quiral DIRECTA UNIDIMENSIONAL.....	235
I.4.1. Características analíticas del método	238
I.4.2. Determinación quiral unidimensional del diclofop-metil y diclofop-ácido en un preparado comercial.....	240
I.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP METIL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL HPLC aquiral – HPLC quiral.....	243
I.5.1. Separación cromatográfica primaria de ambos herbicidas.....	243
I.5.2. Optimización del acoplamiento cromatográfico bidimensional.....	249
I.5.2.1. Características analíticas del método bidimensional para el análisis quiral del diclofop-ácido y diclofop-metil.....	256
I.5.3. Determinación quiral bidimensional del diclofop-metil y diclofop-ácido en un preparado comercial.....	259
PARTE II: DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y SUS PRECURSORES L-TRIPTÓFANO Y 5-OH-TRIPTÓFANO, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	265
II.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LA SEROTONINA Y SUS PRECURSORES MEDIANTE cLC-MS.....	265
II.1.1. Ensayos preliminares.....	265
II.1.2. Ajuste de los parámetros del espectrómetro de masas	267
II.1.3. Optimización de las condiciones cromatográficas y de focalización mediante análisis de superficie de respuesta.....	269
II.1.3.1. Características analíticas del método.....	279
II.2. DETERMINACIÓN DE SEROTONINA, 5-OH-TRIPTÓFANO, Y L-TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE.....	282
II.2.1. Optimización del proceso de extracción	282
II.2.2. Determinación de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao.....	290
PARTE III: DETERMINACIÓN DE D-AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS TRATADOS CON RADIACIONES IONIZANTES. ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN SU COMPOSICIÓN.....	295

III.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO	296
III.1.1. Ensayos previos	296
III.1.2. Optimización de la separación de los enantiómeros de los aminoácidos mediante diseño experimental y análisis de superficie de respuesta	300
III.1.2.1. Características analíticas de los métodos de separación quiral de patrones individuales de aminoácidos	308
III.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL HPLC aquiral – HPLC quiral.....	311
III.2.1. Separación cromatográfica primaria de los aminoácidos y sus productos de degradación.....	311
III.2.2. Optimización del acoplamiento cromatográfico bidimensional para el análisis quiral de aminoácidos.....	318
III.2.2.1. Características analíticas del método bidimensional para el análisis quiral de la tirosina, fenilalanina y triptófano	326
III.2.3. Determinación de las posibles transformaciones de la tirosina, fenilalanina y triptófano en alimentos listos para el consumo (RTE) tratados con radiaciones ionizantes.....	330
III.2.3.1. Optimización del proceso de extracción	331
III.2.3.2. Evaluación de las posibles transformaciones quirales de la tirosina, fenilalanina y triptófano en alimentos, así como de la formación de sus principales productos de degradación en alimentos listos para el consumo (RTE) tratados con radiaciones ionizantes.....	340
III.2.4. Evaluación mediante herramientas quimiométricas del efecto de la radiación ionizante en la composición química de los alimentos listos para el consumo.....	352
III.2.4.1. Elección de los parámetros composicionales evaluados	353
III.2.4.2. Análisis composicional	354
III.2.4.3. Análisis de la varianza ANOVA de un factor	357
III.2.4.4. Análisis de componentes principales.....	362
III.2.4.5. Regresión lineal múltiple (MLR) paso a paso para la evaluación del cambio en el contenido de nitratos y nitritos	368
CONCLUSIONES	371
BIBLIOGRAFÍA	390

ANEXO I

Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 2303-2309.

Título: *“One- and Two-Dimensional Direct Chiral Liquid Chromatographic Determination of Mixtures of Diclofop-Acid and Diclofop-Methyl Herbicides”.*

Autores: V. Guillén-Casla, L. V. Pérez-Arribas, M. E. León-González, L. M. Polo-Díez.

ANEXO II

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010) 63-75.

Título: *“Direct chiral determination of free amino acid enantiomers by two-dimensional liquid chromatography: application to control transformations in E-beam irradiated foodstuffs”.*

Autores: V. Guillén-Casla, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez.

ANEXO III

Revista: Journal of Food Composition and Analysis 24 (2011) 456-464.

Título: *“Principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR) statistical tools to evaluate the effect of E-beam irradiation on Ready-to-eat food”.*

Autores: V. Guillén-Casla, N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez.

ANEXO IV

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry 400 (2011) 3547-3560.

Título: *“Direct chiral liquid chromatography determination of aryloxyphenoxypropionic herbicides in soil: deconvolution tools for peak processing”.*

Autores: V. Guillén-Casla, J. Magro-Moral, N. Rosales-Conrado, L. V. Pérez-Arribas, M. E. León-González L. M. Polo-Díez.

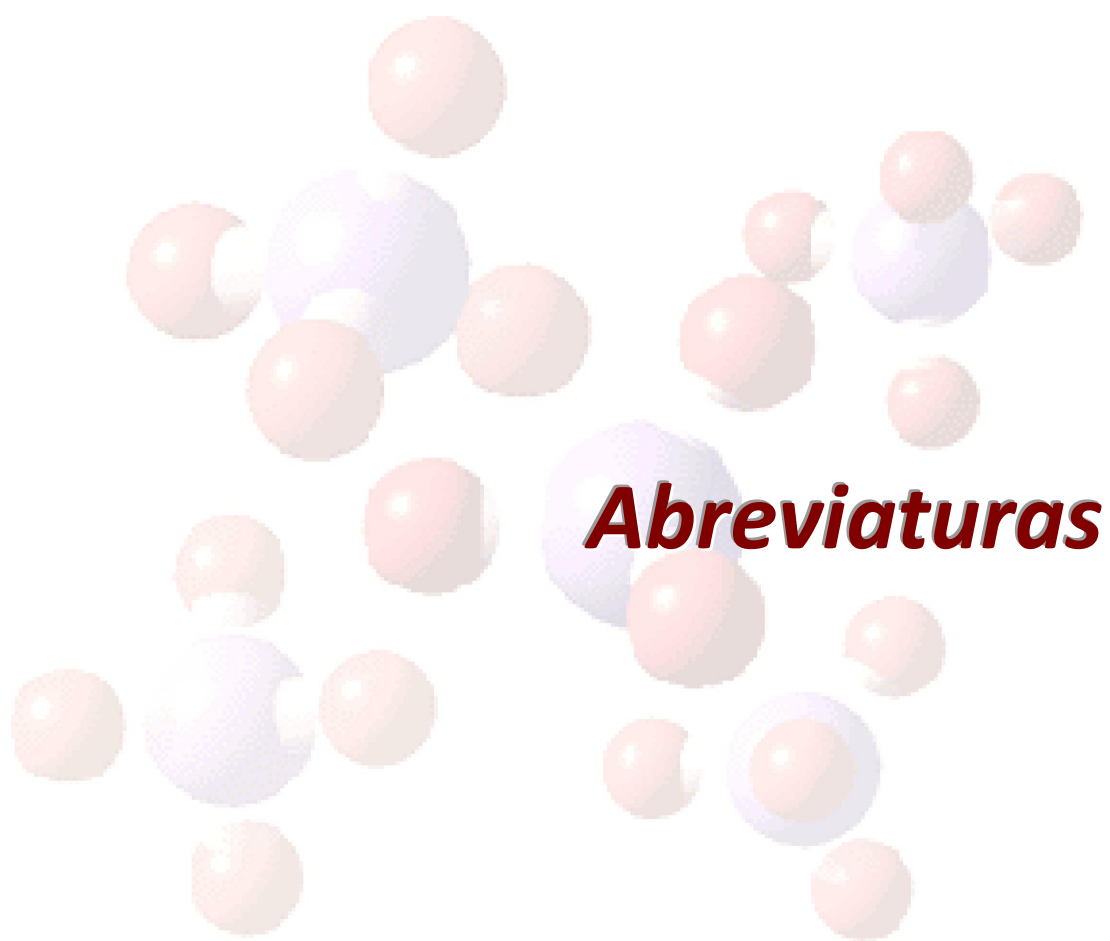
ANEXO V

Revista: Journal of Chromatography A In Press (2011)

Título: *“Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection”.*

Autores: V. Guillén-Casla, N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez.

ANEXO VI: Comunicaciones a congresos internacionales



ABREVIATURAS

- $[\alpha]^{25}_D$: Poder rotatorio específico a 25 °C.
- 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- 5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina.
- 5-HTP: 5-hidroxitriptófano.
- 5-OH-Trp: 5-hidroxi-triptófano.
- aa: Aminoácidos.
- AcN: Acetonitrilo.
- AGP: α -glicoproteína.
- Ala: Alanina.
- ANOVA: Análisis de la varianza.
- APCI: Ionización química a presión atmosférica.
- APPI: Fotoionización a presión atmosférica.
- AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato.
- Arg: Arginina.
- ASCII: Del inglés: “*American Standard Code for Information Interchange*”.
- Asn: Asparagina.
- Asp: Ácido Aspártico.
- a_w : Actividad del agua.
- BSA: Albúmina sérica bovina.
- C1: Columna cromatográfica primaria.
- C2: Columna cromatográfica secundaria.
- CD: Ciclodextrina.
- CD: Dicroísmo circular.
- CE: Electroforesis capilar.
- CEC: Electro cromatografía capilar.
- cLC: Cromatografía de líquidos capilar.
- CMPA: Aditivo quirál de la fase móvil.
- CSP: Fase estacionaria quirál.
- Cys: Cisteína.
- DA: Diclofop-ácido.
- DAD: Detector de hilera de diodos.
- DFDNB: Difluorodinitrobenzeno.
- DM: Diclofop-metil.

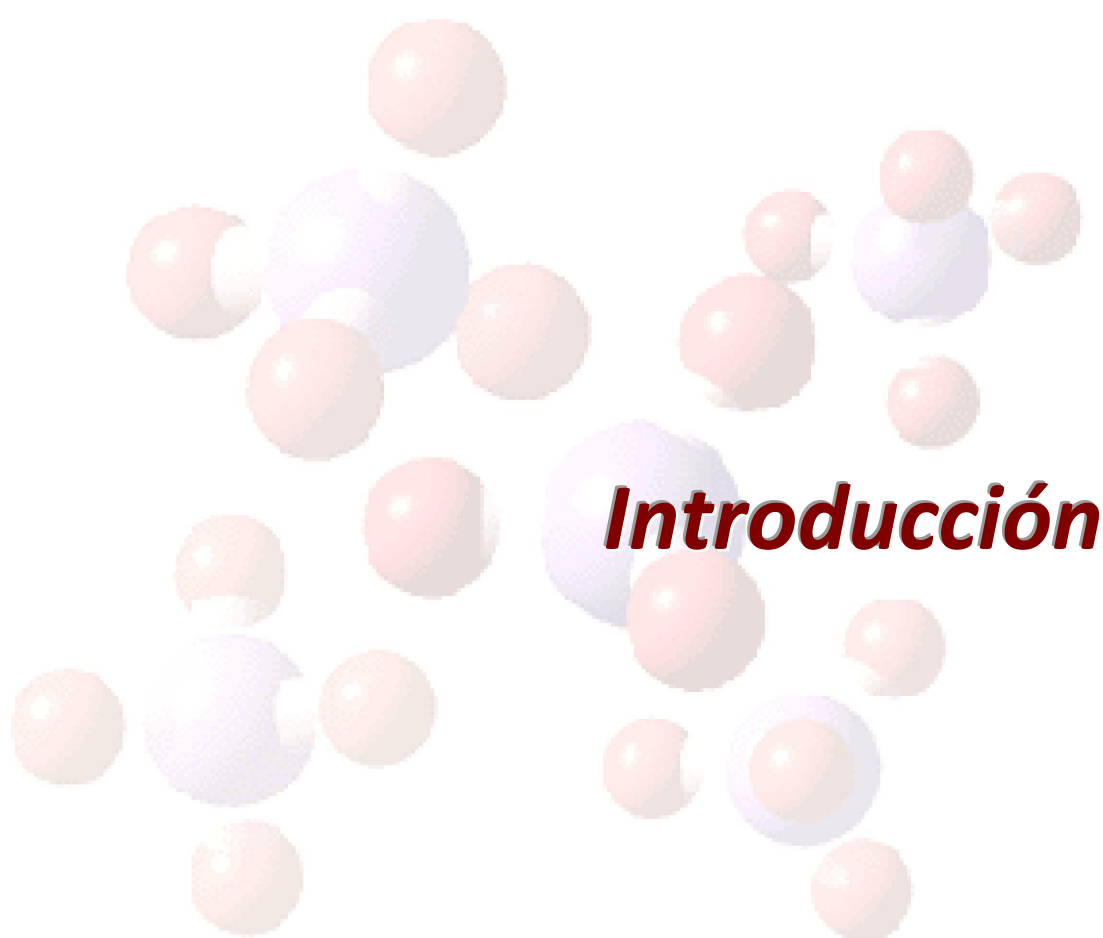
- DMAA: N, N-dimetilacrilamida.
- e.e: Exceso enantiomérico.
- Ec. : Ecuación.
- ECD: Detector de captura electrónica.
- EDTA: Disodio etilendiamina tetraacetato dihidratado.
- EF: Fracción enantiomérica.
- EI: Ionización por electroimpacto.
- EMG: Función Gaussiana exponencialmente modificada.
- EMS: Síndrome de mialgia eosinofílica.
- ER: Relación enantiomérica.
- ESI: Ionización por electrospray.
- F: Relación de varianzas.
- FAB: Bombardeo de átomos rápidos.
- FAO: Del inglés "*Food and Agriculture Organization*".
- FB: Fliazifop-butil.
- FDAA: N-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanina amida.
- FID: detector de ionización en llama.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
- FLD: Detección mediante fluorescencia.
- FMOC: 9-fluorenilmetil cloroformato.
- fops: Herbicidas ariloxifenoxipropiónicos.
- FSO: Del inglés "*Food safety objective*".
- g a.i.ha: Del inglés "Grams active ingrediente per hectare".
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
- GC: Cromatografía de gases.
- GCB: Carbón negro grafitado.
- GD: Distribución Gaussiana.
- GEX: Función exponencial generalizada.
- Gln: Glutamina.
- Glu: Ácido Glutámico.
- Gly: Glicocola.
- HF-LPME: Microextracción en fase líquida mediante fibra hueca.
- HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica.
- His: Histidina.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

- HS: Espacio de cabeza.
- HTLC: Cromatografía líquida de alta temperatura.
- IBLC: Isobutiril-L-cisteína.
- ICMSF: Del inglés *"International Commission on Microbiological Specifications for Foods"*.
- IDA: Ingestión Diaria Admisible.
- Ile: Isoleucina.
- IR: Espectroscopía de infrarrojo.
- ISI: Interfase de ionspray.
- IUPAC: Del inglés *"International Union of Pure and Applied Chemistry"*.
- k: Factor de retención.
- LC: Cromatografía de líquidos.
- LC₅₀: Dosis letal media en experimentos de inhalación.
- LC-GC: Cromatografía de líquidos acoplada a cromatografía de gases.
- LD₅₀: Dosis letal media.
- LIF: Fluorescencia inducida por láser.
- LMR: Límite Máximo de Residuos.
- LOD: Límite de detección.
- LOQ: Límite de cuantificación.
- LP: Luz Pulsada.
- Lys: Lisina.
- MAA: Meacrilamida.
- MALDI: Del inglés: *"Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization"*.
- MAO: Enzima Monoaminooxidasa.
- MCTA: Triacetilcelulosa microcristalina.
- MD: mefenpyr-dietil.
- MDGC: Cromatografía de gases multidimensional.
- MDLC: Cromatografía de líquidos multidimensional.
- MEKC: Cromatografía electrocinética micelar.
- MeOH: Metanol.
- Met: Metionina.
- MIP: Polímero de impresión molecular.
- MLR: Análisis de regresión múltiple.
- MRA: Análisis multirespuesta.
- MRM: Monitorización de múltiples reacciones.

- MRT: Test de rango múltiple.
- MS: Espectrometría de masas.
- MSD: Detector selectivo de masa.
- MTBE: Tert-Butil metil eter.
- *m*-Tyr: *meta*-tirosina.
- MWCNTs: Nanotubos de carbono de pared múltiple.
- NALC: *N*-acetil-L-cisteína.
- NASA: Del ingles "*National Aeronautics and Space Administration*".
- NBD-F: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol.
- NP: Cromatografía de líquidos en fase normal.
- ODS: Octadel silano.
- OGM: Organismo genéticamente modificado.
- OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica
- OMS: Organización Mundial de la salud.
- OPA: o-ftaldialdehido.
- *o*-Tyr: *orto*-tirosina.
- p.e= Pureza enantiomérica.
- P: Coeficiente de partición octanol/agua.
- P: Pureza óptica.
- P: valor de probabilidad.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PC: Componente principal.
- PCA: Análisis de componentes principales.
- PEF: Pulsos eléctricos de alta intensidad.
- PF: Punto de fusión.
- Phe: Fenilalanina.
- pI: Punto isoeléctrico.
- PIM: Modo iónico polar.
- PITC: Fenil isotiocianato.
- POM: Modo orgánico polar.
- Pro: Prolina.
- PrOH: 2-Propanol.
- PSA: Amina primaria /secundaria.
- PTEF: Politetrafluoroetileno.
- Pv: Presión de vapor.

- QE: Quizalofop-etil.
- QqQ-MS. Analizador de triple cuadrupolo.
- QuEChERS. Del ingles: “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe”.
- RD. Real Decreto.
- REACH: Del ingles “*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*”.
- RP: Cromatografía de líquidos en fase inversa.
- Rs: Resolución enantiomérica.
- RSA: Análisis de superficie de respuesta.
- RSD: desviación estándar relativa.
- RTE: Del ingles “*Ready To Eat*”.
- SCAN: Espectro de barrido completo.
- SEE: Error estandar de la estimación.
- Ser: Serina.
- SIM: Modo de iones seleccionados.
- SPE: Extracción en fase sólida.
- SRM: Del ingles “*Selected reaction monitoring*”.
- SVHC: Del ingles “*substance of very high concern*”.
- t_0 : Tiempo básico.
- TCA: Ácido trifluoroacético.
- TEA: Trietilamina.
- TEAA: Acetato de trietilamonio.
- TFA: Ácido trifluoroacético.
- THF: Tetrahidrofurano.
- Thr: Treonina.
- TISP: Electrospray asistido por turbonebulización
- TLC: Cromatografía en capa fina.
- TL-UV: Detector ultravioleta con lente térmica de detección.
- TOF: Tiempo de vuelo.
- tr_1 : Tiempo de retención corregido del primer enantiómero eluido.
- tr_2 : Tiempo de retención del segundo enantiómero eluido.
- tr_2' : Tiempo de retención corregido del segundo enantiómero eluido.
- Trp: Triptófano.
- Tyr: Tirosina.
- u.f.c. : Unidades Formadoras de Colonias.

- U: Potencial de corriente continúa.
- UE: Unión Europea.
- UPLC: Cromatografía de líquidos de ultra-alta presión.
- USDA: Del inglés *"United States Department of Agriculture"*.
- UV: Espectroscopía de ultravioleta.
- V: Potencial de radiofrecuencia.
- Val: Valina.
- VB: Valor biológico.
- VDM: Método de la caída de valle.
- $W_{1/2(1)}$ = Anchura a media altura del primer enantiómero eluido.
- $W_{1/2(2)}$ = Anchura a media altura del segundo enantiómero eluido.
- WCOT: Del inglés: *"Wall Coated Open Tubular"*.
- WHO: Del inglés *"World Health Organization"*.
- α_{\max} : Poder óptico rotatorio específico de un compuesto puro.
- α : Enantioselectividad.
- α : Poder óptico rotatorio específico de una mezcla.
- ϵ : Absortividad molar.



Introducción

INTRODUCCIÓN

La presencia de asimetría o quiralidad es un hecho que se da frecuentemente en química y en biología y juega un papel muy importante en la naturaleza debido a la distinta actividad que presentan los compuestos enantioméricos. Muchas sustancias naturales como aminoácidos, azúcares, vitaminas, enzimas, etc. y algunas sustancias xenobióticas como productos farmacéuticos o agroquímicos presentan quiralidad. Los compuestos quirales aunque tienen las mismas propiedades físicas y químicas, no presentan ni la misma actividad biológica cuando intervienen en procesos naturales, ni la misma toxicidad, por lo que no debe extrañar el creciente interés que suscita el conocimiento del comportamiento de dichos compuestos y la gran demanda de métodos de análisis para la determinación de la pureza enantiomérica. Así en compuestos naturales quirales sólo uno de los enantiómeros es sintetizado o metabolizado por los organismos. En el caso de los aminoácidos únicamente el isómero L- y no el D- forman parte de las proteínas y es metabolizado. La naturaleza siempre va a mostrar preferencia por una de las dos formas enantioméricas, fenómeno al que se le conoce como homoquiralidad biológica.

El éxito de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos se debe principalmente a dos de sus propiedades: su fuerte actividad herbicida, lo que permite utilizarlos en dosis muy pequeñas y económicas y su gran selectividad, ya que actúan únicamente sobre malas hierbas de hoja ancha, por lo que tienen gran aplicación en cultivos de cereales y gramíneas. Estos herbicidas se suelen aplicar junto con otro tipo de herbicidas llamados protectores cuya misión es proteger a las plantas de cultivo del daño que pueda producir el herbicida y aumentar la selectividad de éste. Por otro lado, muchos de los herbicidas presentan centros esterogénicos en su estructura química, lo que hace que más del 25% de estos productos sean quirales. Por razones de economía en los procesos industriales de síntesis y purificación, la mayoría de ellos se comercializan como mezclas racémicas. Es el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos objeto de esta tesis, habitualmente se utilizan como racemato a pesar de que únicamente el isómero R presenta actividad herbicida y actúa sobre la mala hierba. En consecuencia, el otro 50% del producto utilizado permanece inactivo, acumulándose y dañando el medioambiente o los seres vivos que existen en el medio dónde se aplican.

En otro orden de cosas, en los últimos años estamos asistiendo a un profundo cambio de los hábitos alimentarios actuales lo que ha provocado que la industria alimentaria transforme alimentos ya procesados (jamón, embutidos, diversos tipos de pescado ahumado, quesos, hortalizas frescas, etc.) en productos listos para el consumo (RTE). Esta situación conlleva una reducción del tamaño de presentación (lonchas, filetes, rodajas, piezas pequeñas, etc.) y un aumento del riesgo de contaminación de estos alimentos durante las operaciones de cortado, loncheado, dosificado, etc. ya que son muchos los microorganismos patógenos que pueden alcanzar el alimento. De estos microorganismos patógenos, *L. monocytogenes* es quizás, el más preocupante debido a su ubicuidad y a su facilidad de adherencia a las superficies de las carnes y a los biofilms, consiguiendo así una gran persistencia en los ambientes donde se procesan alimentos. Las exigencias de las autoridades sanitarias con respecto a la máxima seguridad microbiológica en este tipo de alimentos son muy rigurosas ya que tratan de salvaguardar la salud de los consumidores. En este aspecto, la irradiación de alimentos surge como un tratamiento eficaz en la higienización de los mismos. Dicho tratamiento se basa en el empleo de electrones acelerados capaces de eliminar las bacterias y demás organismos patógenos que puedan alcanzar el alimento. Aunque es un tratamiento limpio que no conlleva ninguna manipulación del alimento, muchos son los estudios que sugieren que el haz de electrones puede provocar cambios en la composición química y en las características organolépticas de los alimentos. Entre estos cambios cabe destacar el efecto sobre los aminoácidos del alimento, ya que es frecuente que el perfil de aminoácidos libres varíe en función de la dosis de radiación, se produzcan productos de degradación derivados de los mismos o incluso que los aminoácidos pasen de tener configuración L- a D-. Teniendo en cuenta que todos los aminoácidos que aparecen en la naturaleza y que forman parte de las proteínas pertenecen a la serie estereoquímica L, la presencia de D-aminoácidos en alimentos puede dar lugar a una dieta más pobre en nutrientes y a productos menos seguros desde un punto de vista toxicológico.

Por todo lo expuesto anteriormente y debido a su implicación medioambiental y de la seguridad alimentaria, hoy en día surge la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que permitan el análisis quiral tanto de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos como de aminoácidos. La separación enantiomérica de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos, se ha llevado a cabo mediante numerosas estrategias de análisis, siendo la cromatografía quiral directa la más utilizada. El empleo de fases estacionarias quirales es una alternativa robusta que

proporciona resultados reproducibles. Sin embargo, en dichas separaciones resulta muy difícil conseguir la total enantioresolución en un tiempo de análisis razonable, obteniéndose en la mayoría de los casos una resolución parcial en la que los picos de los enantiómeros se encuentran parcialmente solapados. Dadas las dificultades existentes para encontrar condiciones cromatográficas que permitan la separación total, en muchos casos la aplicación de modelos matemáticos de deconvolución puede ser una estrategia eficaz para el tratamiento de la señal cromatográfica. Así se pueden minimizar los errores asociados al sesgo de los picos y por tanto, obtener resultados más exactos en el cálculo de las áreas de pico cromatográfico, haciendo idóneas estas herramientas para la estimación de las fracciones o relaciones enantioméricas de tanta utilidad en análisis medioambiental.

Sin embargo, el principal problema que presentan estas fases estacionarias quirales es la falta de universalidad, es decir, son altamente específicas para la resolución de enantiómeros pero poco selectivas en el caso de la separación de otros compuestos. Por otra parte, operan en condiciones de trabajo restringidas y exigen muestras extremadamente limpias para garantizar su integridad tras un gran número de análisis. Una forma de mejorar la selectividad y a la vez introducir muestras limpias en la columna quiral es la utilización de acoplamientos cromatográficos bidimensionales. En este tipo de separaciones, la muestra inicialmente se somete a una primera separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria y condiciones mas selectivas, tras lo cual, los componentes de interés de la muestra, ya separados, son transferidos a una segunda columna donde se someten a otra separación adicional aumentando la eficiencia, selectividad, capacidad de pico y sensibilidad en la determinación del analito.

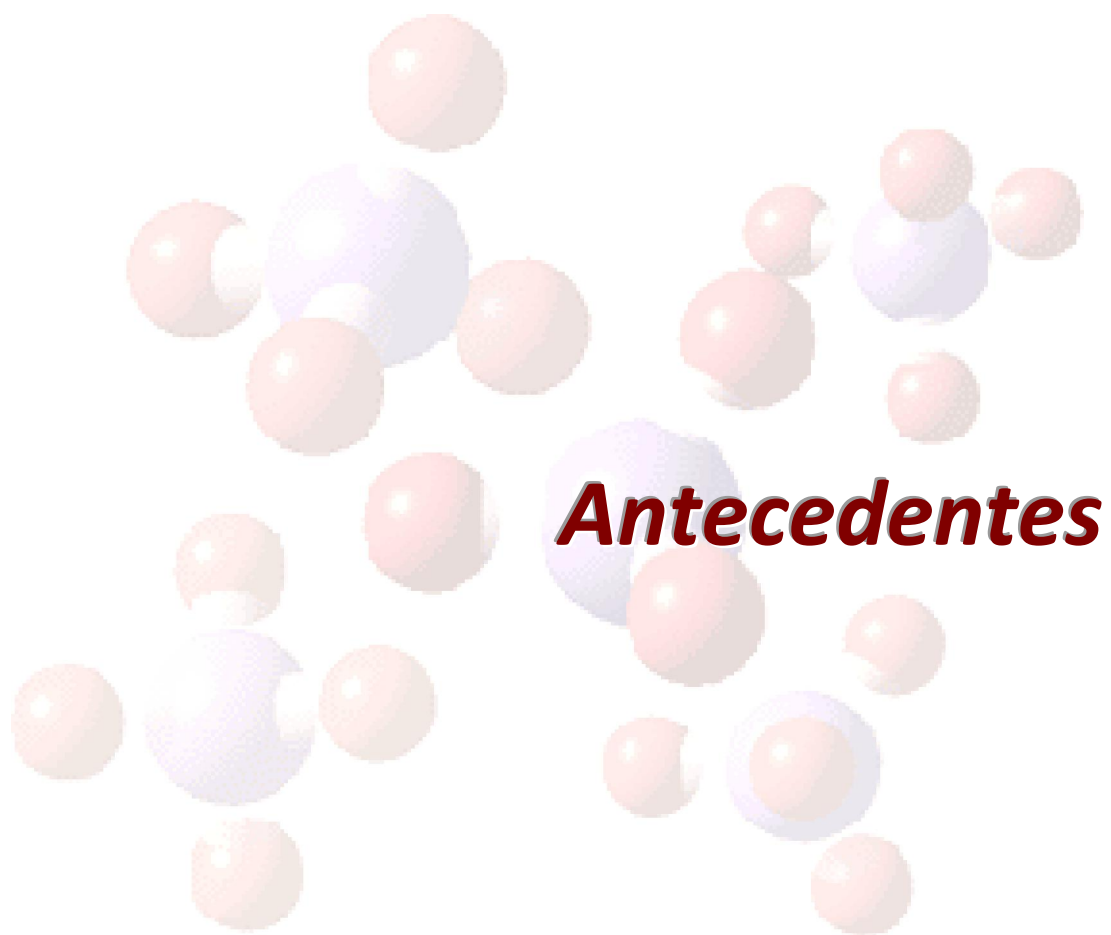
Este tipo de acoplamientos bidimensionales se está convirtiendo en una de las alternativas más prometedoras en el análisis quiral de muestras complejas. Mediante el acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral, en una primera dimensión se puede llevar a cabo la separación de los compuestos quirales de los demás componentes de la muestra compleja, para que después, selectivamente, mediante una válvula de desplazamiento, la mezcla de enantiómeros sean transferidos a la columna quiral dónde se pueden separar. Con la transferencia única del pico de interés a la columna quiral se aseguran extractos limpios, evitando los problemas de coelución de componentes de la matriz con el analito de interés y alargando el tiempo de vida útil de la fase estacionaria quiral. Por otra parte el efecto adicional de limpieza en línea evita pretratamientos previos como la precipitación, extracción en fase sólida, secado

filtración etc. que en muchos casos resultan muy laboriosos y no del todo eficaces, proporcionando análisis sencillos y en un menor espacio de tiempo.

Actualmente existe un creciente interés por el consumo de aquellos alimentos denominados "alimentos de la felicidad o del bienestar", es decir, alimentos que de forma natural elevan el estado de ánimo. Entre todos estos alimentos cabría destacar el chocolate cuyo consumo se asocia en muchas ocasiones a situaciones relacionadas con la angustia, el estrés o la preocupación. Además del efecto estimulante que proporcionan componentes del cacao como la cafeína, feniletilamina, teobromina y anandamina, el chocolate puede contener pequeñas cantidades del neurotransmisor serotonina, así como de sus precursores L-triptófano y 5-OH-triptófano, en cantidades de unos pocos $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ lo que explicaría la sensación placentera que provoca su consumo y el efecto adictivo del mismo. Así pues, la determinación de este tipo de analitos en alimentos a estos niveles de concentración requiere de técnicas de gran sensibilidad.

En los últimos años, los esfuerzos realizados para mejorar la sensibilidad de los métodos de HPLC han permitido desarrollar columnas de diámetro interno reducido que presentan claras ventajas analíticas en términos de eficacia y sensibilidad, además de permitir el empleo del uso de grandes volúmenes de inyección mediante focalización en cabeza de columna y de presentar gran facilidad de acoplamiento con la espectrometría de masas. Estos sistemas capilares al disminuir considerablemente el caudal de fase móvil utilizado, permiten un menor consumo de disolventes orgánicos y cantidad de residuos generada, siendo de gran utilidad para determinaciones de compuestos a niveles traza en matrices complejas.

Así pues, el presente trabajo se centra en el desarrollo de nuevas metodologías cromatográficas tanto unidimensionales como acoplamientos cromatográficos bidimensionales, que permitan la determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos en matrices de interés medioambiental y agroalimentario, con el fin de evaluar su incidencia en el medioambiente y en la salud humana. Por otra parte, puesto que la cromatografía líquida capilar proporciona gran sensibilidad, se pretende desarrollar metodologías de análisis de compuestos de interés alimentario que se encuentren en concentraciones muy bajas, teniendo en cuenta principalmente el estudio de las técnicas de inyección que posibiliten la focalización en cabeza de columna y aumenten la sensibilidad del análisis.



2. HERBICIDAS

2.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE HERBICIDAS

La presencia de hierbas indeseables creciendo junto a los cultivos puede originar numerosos problemas relacionados con la disminución de la producción, la calidad de las cosechas y por las dificultades en el laboreo y recolección, lo que ha hecho que en las última décadas se haya impuesto el uso generalizado de herbicidas como una de las operaciones para conseguir un mayor rendimiento de las cosechas.

Para que un herbicida alcance un uso amplio en la práctica agrícola debe reunir determinadas condiciones básicas:

- Efectividad. Debe ser eficaz en la destrucción de la mala hierba contra la que se aplica cuando es aplicado en pequeñas dosis.
- Selectividad. Debe destruir únicamente la maleza contra la que lucha sin afectar al resto del cultivo.
- Economía. Su uso debe producir unos beneficios que superen el gasto que supone su utilización.
- Seguridad. No puede ser fitotóxico, ni constituir un peligro para la salud del hombre o del resto de organismos vivos del entorno.
- Posibilidad de formulación. Debe ser compatible con soportes y diluyentes, dando lugar a formulaciones estables y efectivas.

El producto activo del herbicida es obtenido por la industria química con un grado de pureza variable entre el 75% el 98% según los casos, siendo el resto impurezas de su fabricación. Este producto llamado técnicamente puro no es apto casi en ningún caso para su empleo agrícola ni de forma directa o indirecta y debe acondicionarse antes de la formulación. Dicha formulación comercial normalmente puede contener uno o más principios activos, más o menos diluidos, en un soporte sólido o en un disolvente, además de otras sustancias auxiliares que pueden mejorar su acción (1).

2.1.1. CLASIFICACIÓN

Debido al elevado número de sustancias que se emplean como herbicidas, con el fin de conocer y entender sus propiedades es necesario realizar su clasificación atendiendo a varios criterios (1, 2):

- **Selectividad**

De acuerdo con este criterio los herbicidas se pueden clasificar en selectivos y no selectivos.

Los **herbicidas no selectivos o totales** se utilizan cuando es necesario un control total durante un largo período de tiempo como es el caso de la eliminación de plantas en áreas industriales, bordes de carretera, taludes de zanjas, etc. Por el contrario, los **herbicidas selectivos** actúan sobre maleza sin afectar al cultivo de interés. No obstante, si hay una gran similitud biológica entre el cultivo y la mala hierba el control selectivo resulta más complicado y no es fácil llegar a una verdadera selectividad. De todos modos no conviene olvidar que ningún herbicida es completamente selectivo, es decir, de una inocuidad absoluta para la planta cultivada, y que las malas hierbas son sensibles solamente en un momento muy preciso de su vida vegetativa, y muchas veces la selectividad total de un herbicida se puede conseguir cuando se aplica en el momento oportuno y a la dosis correcta (3).

- **Forma de aplicación**

Atendiendo a la dirección o destino del herbicida aplicado se clasifican en:

a) Herbicidas aplicados por vía foliar.

La principal barrera para la absorción de los herbicidas es la cutícula que cubre todas las superficies aéreas de la planta la cual está formada por cera, cuya función es la de minimizar las pérdidas de agua de la planta. Debajo de esta cera se encuentra la capa de cutina más hidrofílica que las ceras superficiales. Así pues, los agentes tensoactivos y otros aditivos de las formulaciones de herbicidas juegan un papel importante en la retención y penetración del herbicida a través de las cutículas

cerosas. En este tipo de tratamientos la acción herbicida depende de la cantidad de producto retenido por las plantas, y por tanto, de la superficie de las hojas.

b) Herbicidas aplicados al suelo.

La eficacia de los herbicidas aplicados al suelo depende de su grado de adsorción a las partículas coloidales de éste, puesto que la adsorción limita el acceso a las raíces y a las semillas de las hierbas. El grado de adsorción sobre las partículas de suelo depende a su vez de su textura, el tipo de arcilla, el contenido de materia orgánica y la humedad del mismo. Tanto es así, que en suelos muy orgánicos las recomendaciones de aplicación no garantizan su eficacia. Por otra parte, los suelos coloidales, arcillosos o húmicos, poseen un poder de adsorción mayor que los arenosos. La naturaleza química del herbicida también condiciona la adsorción. Los herbicidas cargados positivamente no suelen tener actividad en el suelo, ya que quedan fijados fuertemente en los coloides de suelo cargados negativamente. En general los herbicidas poco polares apenas se adsorben, mientras que las sales, derivados de la urea, triazinas, etc., se adsorben fuertemente (3).

▪ **Modo de acción**

a) Herbicidas que actúan por contacto o sistémicos

Estos herbicidas eliminan sólo las partes de la planta con las que entran en contacto (fitotoxicidad o causticidad directa) y tienen un transporte limitado dentro de la planta.

b) Herbicidas residuales

Estos herbicidas en general son aplicados al suelo y afectan a la germinación de las malezas, por lo que para que sean efectivos, deben permanecer en el medio durante algún tiempo.

c) Herbicidas que actúan por traslocación y acción bioquímica

Estos herbicidas una vez que penetran en la planta se trasladan a través del floema o xilema, sistemas vasculares de las plantas, a los cuales concierne el

transporte de compuestos a largas distancias, hasta aquellos lugares críticos más o menos distantes de la zona de aplicación donde se produce su acción tóxica.

Se absorben por las hojas o por las raíces y producen reacciones biológicas y trastornos fisiológicos y/o morfológicos. En general, se pueden dividir en dos grupos principales; **herbicidas hormonales** y **herbicidas inhibidores de la fotosíntesis**. Su selectividad es de orden bioquímico, de modo que si un proceso bioquímico es específico de cada especie de planta, la alteración del mismo por parte del herbicida será la principal causa de efectividad y de destrucción de las malas hierbas sin afectar el resto de especies cultivadas. Los herbicidas traslocados pueden ser efectivos contra todas las clases de malezas; sin embargo, su mayor ventaja está en el control de plantas perennes. Para lograr un buen control de malezas con herbicidas traslocados un requisito clave es la aplicación uniforme (2).

Los **herbicidas ariloxifenoxipropiónicos** objeto de estudio de esta tesis, se encuentra dentro de dicho grupo, siendo su principal mecanismo de actuación la inhibición de la acetil coenzima carboxilasa.

- **Época de aplicación**

Según el estado del cultivo y la época de aplicación, los herbicidas se clasifican en:

- a) *Presiembra*

Estos herbicidas se utilizan para control de malezas anuales aplicándose antes de sembrar el cultivo, esterilizando el suelo de todo tipo de plantas.

- b) *Pre-emergencia*

Se aplican después de la siembra pero antes de que broten tanto la maleza como el cultivo, lo que evita la competencia temprana con el cultivo.

- c) *Post-emergencia*

Se aplican después de la germinación del cultivo y cuando la maleza todavía se encuentra en sus primeros estados de desarrollo (1).

▪ Estructura química

Atendiendo a su estructura química los principales herbicidas se pueden clasificar en distintas familias, entre las principales se citan: **fenoxiácidos y derivados, carbamatos, ácidos alifáticos clorados y aromáticos halogenados, derivados del benzonitrilo, ureas, derivados del ácido ariloxifenoxipropiónicos, cloracetamidas, anilidas, diazinas y triazinas**. En general, los herbicidas dentro de una familia química presentarán propiedades químicas similares y en principio el mismo modo de acción.

Además de las anteriores, cabe destacar la actividad herbicida de las siguientes familias:

- Derivados del ácido ftálico.
- Compuestos organofluorados.
- Derivados de dipiridilo.
- Fenoles sustituidos.

▪ Persistencia

La persistencia de un herbicida en el suelo puede variar desde 2 a 3 semanas hasta 3 a 6 meses, aunque este tiempo puede estar influenciado por diversos factores como la actividad microbiana, el carbono orgánico del suelo, cantidad de nutrientes, pH, salinidad, temperatura, contenido de oxígeno y humedad (4). Así dependiendo del grado de persistencia del herbicida en el suelo, estos podrán clasificarse en (1).

- a) *Poco persistentes o no residuales*: Muestran actividad en las primeras fases del cultivo
- b) *Persistentes o residuales*: Son activos durante la duración del cultivo y parte de la recolección.
- c) *Muy persistentes o muy residuales*: perduran a lo largo del tiempo.

2.1.2. DINÁMICA DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO

La concentración de los herbicidas en el suelo a lo largo del tiempo, su persistencia o residualidad, depende tanto de las características propias de la molécula (acidez o alcalinidad, solubilidad en agua, presión de vapor) como de su

grado de interacción con el suelo y de la constitución del mismo (textura y materia orgánica), así como de factores ambientales como la temperatura y humedad (5).

- **Relación de las características del herbicida con las propiedades del suelo**

- a) Grado de acidez o alcalinidad*

Este parámetro determina la capacidad del herbicida para permanecer en la solución del suelo o ser retenido en las partículas coloidales de éste. Los herbicidas no iónicos son poco adsorbidos por las arcillas del suelo, mientras que los herbicidas ácidos se absorben con mayor facilidad, en un intervalo amplio de pH. Sin embargo, los herbicidas fuertemente básicos se inactivan rápidamente por los coloides del suelo al ser adsorbidos fuertemente tanto por los minerales de la arcilla como por la fracción orgánica, debido a los intercambios con otros cationes que se suelen presentar en ambas superficies.

- b) Adsorción o retención por partículas coloidales*

Los constituyentes coloidales del suelo se pueden dividir en materia orgánica, tanto húmica (ácido húmico, fúlvico y huminas) como no húmica (carbohidratos, proteínas, aminoácidos), y en fracción mineral (arcilla y óxidos amorfos e hidróxidos). El fenómeno de adsorción se encuentra influenciado por la capacidad de intercambio iónico de los coloides, de modo que la carga de la molécula herbicida estará íntimamente relacionada con la adsorción. En general, los herbicidas con elevada retención en el suelo no están sujetos a pérdidas por lixiviación.

- c) Solubilidad en agua*

La solubilidad del herbicida en agua determinará la proporción del mismo que se encuentra disponible en disolución y por tanto, podrá ser adsorbido por la planta. Si el herbicida es muy soluble, apenas se retendrá en los coloides del suelo.

- d) Volatilidad*

Los herbicidas con presión de vapor elevada tienen mayor tendencia a volatilizarse en la atmósfera. Un herbicida volátil aplicado en suelo húmedo se

volatiliza más fácilmente que en suelo seco, debido a que la existencia de una pequeña película de agua que recubre las partículas del suelo, dificulta la adsorción del herbicida.

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos son considerados como **herbicidas de persistencia corta** ya que apenas son retenidos por las partículas coloidales del suelo, caracterizándose además por poseer una **solubilidad baja en agua** y una **volatilidad baja** (6).

2.2. HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS

2.2.1. INTRODUCCIÓN

Los **herbicidas ariloxifenoxipropiónicos** conocidos también como “**fops**”, debido al sufijo de la mayoría de sus nombres químicos, fueron desarrollados por primera vez en Japón y posteriormente en Alemania, siendo el diclofop-metil el primero de ellos en ser comercializado en 1979. Dichos herbicidas presentan como estructura general la del **ácido ariloxifenoxipropiónico**. Su gran éxito se ha debido principalmente a dos de sus propiedades; la fuerte actividad herbicida, que permite utilizarlos en dosis muy pequeñas y económicas y su gran selectividad. Las características generales de su acción herbicida son las siguientes:

- Actúan por traslocación y en menor medida por contacto y normalmente requieren de la adición de un coadyuvante el cual mejora la cobertura de la hoja y la absorción del mismo. En general, presentan poca actividad en el suelo y son realmente eficaces en las hierbas emergentes cuando son aplicados en modo de post-emergencia.
- Estos herbicidas son traslocados tanto por el floema como por el xilema, afectando a la síntesis de lípidos a través de la inhibición de la coenzima acetil-CoA-carboxilasa, localizada en el protoplasto.
- La mayoría de ellos tienen una baja solubilidad en agua, por lo que son formulados y comercializados en forma de ésteres mucho más solubles, los cuales son absorbidos por la planta y rápidamente hidrolizados dando lugar a la forma ácida, la cual es la que lleva a cabo la verdadera acción herbicida. Su toxicidad para animales superiores es moderada y según el Registro Oficial de

Productos Fitosanitarios, se consideran productos medianamente tóxicos que se deben emplear con precauciones mínimas (2, 8).

- Actúan selectivamente contra las malas hierbas por lo que tienen gran aplicación en cultivos de avena, trigo, otros cereales.

La figura 1, muestra el nombre y estructura química de los principales herbicidas ariloxifenoxipropiónico

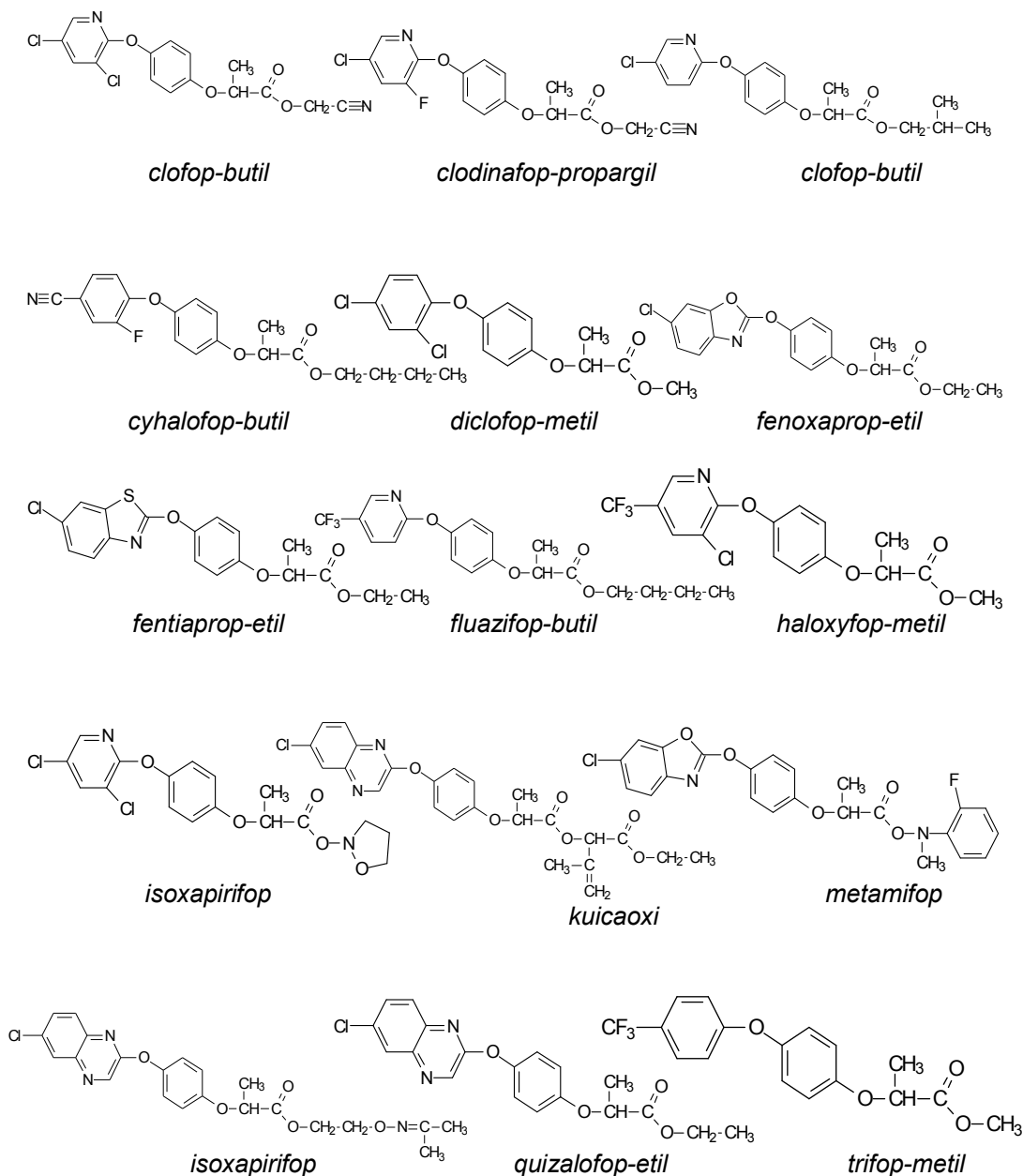


Figura 1. Nombres y formulas de los principales herbicidas ariloxifenoxipropiónicos

2.2.2. PRESENTACIÓN Y USOS

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos comerciales se suelen presentar en forma de diferentes ésteres de estos ácidos (ej. metil, etil, isopropil, etoxietil ésteres) formulándose como concentrados emulsionables, aunque también se utiliza el ácido libre. Los ésteres emulsificados en aceite poseen una gran aceptación comercial debido a su mayor actividad herbicida, poder de penetración y baja presión de vapor. Estos herbicidas son muy efectivos para el control selectivo de muchas especies de gramíneas tanto anuales como perennes, además, como no tienen ningún efecto sobre especies de hoja ancha y monocotiledóneas, los ariloxifenoxipropiónicos se utilizan ampliamente en cultivos de herbáceos y césped o en la mayoría de las frutas y hortalizas, arroz, algodón, maní, soja, lino, trigo, cebada, césped, plantas ornamentales ó forestales.

Normalmente se aplican en la parte aérea de las hojas o en la base de los árboles o arbustos a controlar. Los tratamientos se deben hacer cuando las plantas cultivadas tienen de 20 a 25 cm de altura y siempre en cultivos no sensibles, utilizando una concentración que puede variar entre el 0.5 y el 12% dependiendo del emulsionable o aceite que actúa de soporte. Las dosis pueden variar según el producto y las condiciones ambientales (2,7). La absorción foliar de estos herbicidas es muy rápida. Tanto el éster como el ácido se acumulan en el meristema apical volviéndolo necrótico. El resto del producto aplicado se trasloca controlando los órganos subterráneos de gramíneas perennes.

Este tipo de herbicidas no sólo se emplean por separado sino que también se comercializan mezclas de los mismos entre las que cabe destacar la asociación con otro tipo de sustancias activas como el pinoxaden, o con otro tipo de herbicidas como el mefenpyr-dietil, denominado tipo **“safener”** o **protector** (8). Estos herbicidas son utilizados para mejorar la selectividad de los herbicidas comerciales, protegiendo a su vez a las plantas de cultivo del daño que pueda producir el herbicida aplicado contra la mala hierba. Se puede aplicar ya sea como mezcla con un herbicida determinado o bien junto con las semillas antes de la siembra del cultivo. La acción de los herbicidas protectores se basa en la similitud estructural de dicho herbicida con el herbicida utilizado contra la mala hierba. El protector interacciona directamente con los objetivos bioquímicos o proteínas receptoras de herbicidas en las plantas de cultivo reduciendo la absorción del herbicida activo por parte del cultivo. De este modo, el herbicida activo

es más eficaz sobre la mala hierba que sobre el cultivo. Los herbicidas protectores principalmente se emplean para disminuir la cantidad utilizada de herbicida activo pero también, al ser sustancias no específicas, pueden ser empleados como herbicidas en sí mismos para hacer frente a problemas de malezas que, por razones técnicas o económicas, no pueden ser resueltos por medio de herbicidas selectivos convencionales (9).

La figura 2 muestra el nombre y estructura química del herbicida protector que acompaña a las formulaciones de los principales herbicidas ariloxifenoxipropiónicos.

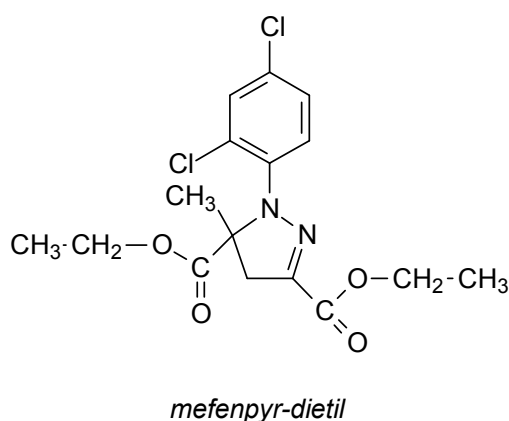


Figura 2. Nombre y formula del principal herbicida protector utilizado con los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos

2.2.3. PROPIEDADES

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos son compuestos de color blanco o incoloros que se pueden presentar en cristales, polvo o en forma líquida. Aunque son compuestos relativamente polares (10, 11), son poco solubles en agua pero muy solubles en disolventes orgánicos cuando se utilizan como ácidos o ésteres. Además, son fácilmente ionizables y en forma ácida poseen valores de pKa en el intervalo comprendido entre 2.7 y 3.43. También presentan baja volatilidad y se hidrolizan lentamente con los ácidos y bases en caliente. En la tabla 1 se muestran las principales características fisicoquímicas de este tipo de herbicidas así como del herbicida protector mefenpyr-diethyl (12, 13).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los principales herbicidas ariloxifenoxipropiónicos

Herbicida [CAS RN]	Estado físico	Fórmula empírica	Masa molecular (g·mol⁻¹)	PF (°C)	Solubilidad agua (mg L⁻¹) 25 °C	pKa	Pv (mmHg) 25 °C	Log P*
cyhalofop-butil [122008-85-9]	Sólido cristalino blanco	C ₂₀ H ₂₀ FNO ₄	357.4	50	0.7	-	1.2 x 10 ⁻³	3.31
diclofop [40843-25-2]	Sólido amarillento	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄	327.2	121	0.453	3.43	2.3 x 10 ⁻¹¹	2.81
diclofop-metil [51338-27-3]	Cristales incoloros	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ O ₄	341.2	40	0.8	-	1.8 x 10 ⁻⁶	4.58
fenoxaprop-P [113158-10-0]	Polvo fino beige	C ₁₆ H ₁₂ ClNO ₅	333.7	158	0.7	-	1.35 x 10 ⁻⁵	1.83
fenoxaprop-P-etil [71283-80-2]	Sólido blanquecino	C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅	361.8	90	0.27	-	3.9 x 10 ⁻⁶	4.58
fluazifop-butil [69806-50-4]	Líquido color pálido	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	383.4	13	1	-	4.1 x 10 ⁻⁷	4.5
haloxyfop [69806-34-4]	Cristales incoloros	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	361.7	108	1.59	2.9	9.9 x 10 ⁻⁶	1.34
haloxyfop-metil [69806-40-2]		C ₁₆ H ₁₃ ClF ₃ NO ₄	375.7	56	9.3	-	6 x 10 ⁻³	4.07
haloxyfop-etil [87237-48-7]		C ₁₉ H ₁₉ ClF ₃ NO ₅	433.8	60	1.91	-	1.2 x 10 ⁻⁷	4.33
propaquizafop [111479-05-1]	Cristales incoloros	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₅	443.9	66.3	0.63	-	3.3 x 10 ⁻⁹	4.78
quizalofop-etil [76578-14-8]	Cristales incoloros	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	372.8	92.	0.3	-	6.4 x 10 ⁻⁶	4.28
mefenpyr-dietil [135590-91-9]	Cristales blanco- beige	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₄	373.2	51	20	-	4.7 x 10 ⁻⁵	3.83

*

A continuación se detallan alguna de las características más importantes de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y de tipo protector objeto de estudio en esta tesis.

a) Diclofop-ácido y diclofop-metil

El diclofop-metil y diclofop-ácido se absorben principalmente por las hojas y raíces en caso de suelos húmedos. El diclofop-metil es ampliamente utilizado para el control de malas hierbas en cultivos de girasoles, cacahuetes y dicotiledóneas, transformándose rápidamente en diclofop-ácido el cual, se trasloca en el interior de la planta ejerciendo su acción tóxica como inhibidor de la síntesis de ácidos grasos mediante la inhibición de la acetil CoA carboxilasa, destruyendo la membrana celular y evitando la traslocación de las sustancias asimiladas por las raíces (14). El diclofop-ácido es mucho más soluble que su éster y menos tóxico para vertebrados, ya que puede ser sometido a reacciones metabólicas de desintoxicación de xenobióticos (reacciones de fase I) catalizadas por las esterasas del hígado, facilitando así su excreción por medio de la orina (15).

b) Quizalofop-etil

El quizalofop-etil es un herbicida antigramíneas utilizado para el control de malas hierbas anuales y vivaces. Es absorbido principalmente por las raíces y por las hojas con traslocación por toda la planta, acumulándose y destruyendo tejidos y brotes subterráneos. Es moderadamente adsorbido en suelos arenosos y es fuertemente adsorbido en suelos ricos en limo. Es degradado rápidamente por microorganismos en condiciones aerobias y anaerobias, por lo que el tiempo de permanencia en el suelo es moderado

c) Fluazifop-butil

El fluazifop-butil es también un herbicida antigramíneas que ejerce su acción tóxica como inhibidor de la síntesis de ácidos grasos destruyendo la membrana celular y evitando la traslocación de las sustancias asimiladas por las raíces. Este herbicida es utilizado en cultivos como algodón, soja, frutas de hueso, o café y especialmente efectivo en el control de malas hierbas en cultivos de césped.

d) Mefenpyr-dietil

El mefenpyr-dietil es un herbicida protector con la misma actividad que los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. Su misión es la mejora de la selectividad del herbicida, en concreto es frecuente su aplicación para mejorar el control selectivo de malezas de hoja ancha como la avena negra o el raigrás anual en cultivos de trigo (2,7).

2.2.4. MECANISMO DE ACCIÓN Y SELECTIVIDAD

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos actúan tanto por contacto como por traslocación y normalmente requieren de la adición de un coadyuvante para mejorar la cobertura de la hoja y la absorción del mismo. Estos herbicidas inhiben la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa, enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de ácidos grasos. En plantas, tanto los ácidos grasos de cadena corta como los de cadena larga, son indispensables en la formación de los componentes lipídicos de las membranas y ceras cuticulares respectivamente. La falta de producción de ácidos grasos conduce rápidamente al desorden de las membranas, lo cual se refleja en el cese de la división celular y la necrosis del tejido meristemático; requieren más de una semana para acabar con la mala hierba.

A dosis sub-letales se producen hojas con poca cera cuticular, lo que puede afectar su respuesta a los herbicidas y patógenos. Los tejidos jóvenes en expansión y los meristemos resultan ser los más sensibles afectando esencialmente el sistema interno de membranas. Las malezas manifiestan a los pocos días de la aplicación manchas rojo-violáceas en sus hojas superiores y clorosis progresiva que culmina con la muerte de las plantas afectadas a las 2 ó 3 semanas del tratamiento, según las condiciones ambientales existentes (figura 3). En algunas gramíneas perennes, es frecuente la destrucción de los rizomas y/o estolones a partir de sus yemas y nudos (15).



Figura 3. Deformaciones más comunes causadas por los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos

2.2.5. INTERACCIÓN CON OTROS HERBICIDAS

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos pueden interaccionar con otro tipo de herbicidas, provocando varios efectos:

- Antagonismo del diclofop-metil con muchos herbicidas hormonales: El resultado es que la actividad herbicida del ariloxifenoxipropiónico se reduce en presencia del herbicida hormonal. El antagonismo se debe probablemente a un aumento en la tasa de detoxificación del ariloxifenoxipropiónico por reacciones de conjugación. Las moléculas de ambos grupos de herbicidas son similares y el sistema de conjugación natural de las auxinas podría detoxificar a los ariloxifenoxipropiónico rápidamente.
- Antagonismo del diclofop-metil reduciendo el efecto del 2,4-D: Este último puede ser irreversiblemente detoxificado por arildehidroxilación y posterior conjugación con los ariloxifenoxipropiónicos, o reversiblemente detoxificado por conjugación del grupo carboxilo del herbicida como ácido libre (7,15).

2.2.6. PERSISTENCIA Y DEGRADACIÓN

Los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos más comunes dentro de las formulaciones comerciales (**diclofop-metil**, **quizalofop-etil**, **fluazifop-butil** y **fenoxaprop-etil**) (8), se caracterizan por ser más solubles en agua y a menudo menos persistentes que los herbicidas de vieja generación. Como se ha indicado anteriormente, tras su aplicación, tienden a desaparecer o se degradan en el medio ambiente a través de mecanismos abióticos como la hidrólisis (donde los ésteres se hidrolizan a los ácidos correspondientes), la evaporación, el arrastre por agua, la oxidación, la reducción (donde se sustituyen los átomos de cloro por hidrógenos) y la degradación térmica o fotoquímica, además de los correspondientes mecanismos biológicos, que constituyen la principal vía de eliminación. En ocasiones estos procesos no son suficientes para reducir las concentraciones de herbicidas y su degradación por efecto del calor, luz o microorganismos genera dioxinas, sustancias más tóxicas, peligrosas y persistentes en el medio ambiente que los propios herbicidas (16, 17).

El **fluazifop-P-butil** es considerado un herbicida poco persistente (hasta 16 semanas), con una vida media menor a una semana en suelos húmedos. Este

herbicida se degrada fácilmente en los sistemas terrestres formando su ácido (fluazifop-P) poco persistente también. Ambos compuestos muestran una movilidad baja en los suelos y no representan un riesgo considerable de contaminación para las aguas subterráneas. En el agua en cambio, el fluazifop-p-butil se hidroliza fácilmente a su ácido. Es relativamente estable a la fotodegradación y no es volátil. En las plantas se acumula en las regiones de crecimiento continuo como raíces y brotes.

Por otra parte, **quizalofop-etil** es un herbicida moderadamente persistente (de 60 días a 20 semanas). Sin embargo en suelos donde la actividad microbiana es alta, se degrada rápidamente. Muestra una afinidad moderada a alta por las partículas, por ello su movilidad es baja y no se lixivia significativamente.

La movilidad en suelos del **diclofop-metil** es pequeña o nula, prácticamente no se lixivia, ni se mueve en forma lateral sino que sufre una rápida hidrólisis biológica (en días) bajo condiciones aeróbicas, para formar como principal producto el diclofop-ácido, el cual se degrada a su vez relativamente rápido (vida media de 10 días en suelos arenosos y de 30 días en suelos areno-arcillosos). El diclofop-metil no es volátil bajo condiciones ambientales. En el aire, si se volatiliza, reacciona con los radicales hidroxilo (su vida media es de 21 horas), asociándose también a las partículas atmosféricas que se depositan con la lluvia y el polvo. En agua, este herbicida presenta una vida media muy corta (6.3 días) cuando el pH es básico y muy lenta (1.7 años) cuando el pH es de 7. Se puede bioacumular de forma moderada en los organismos acuáticos y se adsorbe a los sedimentos. Las plantas pueden absorberlo bien a través de sus hojas y de forma limitada por sus raíces. Una vez en el interior de las plantas es translocado a diferentes tejidos (2,7).

2.2.7. EFECTOS TÓXICOS

El tratamiento de los cultivos y las cosechas con herbicidas ariloxifenoxipropiónicos puede causar efectos negativos en los humanos y su medio ambiente, constituyendo un riesgo de contaminación en los alimentos y una posible intoxicación de los consumidores. Su toxicidad es moderada en animales superiores y está relacionada con la presencia de átomos de halógeno en su estructura, que pueden producir efectos teratogénicos y mutagénicos tanto mayores cuanto mayor es el número de átomos de halógeno en su estructura.

Estos herbicidas se absorben principalmente a través de la pared del intestino, pulmón y piel. No son almacenados de manera significativa en la grasa y la excreción se realiza en su totalidad a través de la orina de forma conjugada y en un plazo máximo de 96 horas. La vida media es también mayor como resultado de grandes dosis y exposición prolongada. Sin embargo el hígado es uno de los órganos donde se pueden bioacumular. De hecho, se ha comprobado que tanto el diclofop-metil como el fluazifop-butil a dosis aproximadas de $28 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en ratas, pueden provocar hiperplasia celular en dicho órgano, así como un aumento en la síntesis de ADN y en la actividad mitótica (18, 19).

Aparte de que se presente alguna conjugación de los ácidos, la biotransformación en el cuerpo es limitada, pudiéndose fijar en algunos casos a las proteínas. Los efectos clínicos más comunes pueden ser causados tanto por contacto (irritación, conjuntivitis o dermatitis), como por ingestión (alteraciones gastrointestinales, daño hepatorenal, cefaleas, debilidad muscular) o mediante inhalación (alteraciones respiratorias) (20). Algunos de los herbicidas ácidos, sus sales y sus ésteres son irritantes moderados para la piel, ojos y mucosas respiratoria y gastrointestinal, pudiendo causar despigmentación local aparentemente por contacto dérmico prolongado. Cuando se administran grandes dosis a animales experimentales pueden causar vómito, diarrea, anorexia, pérdida de peso, úlceras en la boca y laringe, y daño tóxico al hígado, riñones y sistema nervioso central. Organismos como la EPA, han realizado estudios de laboratorio sobre rata y ratón, que han permitido concluir que el diclofop-metil puede ser clasificado como posible carcinogénico para humanos. La ingestión de grandes cantidades da lugar a acidosis metabólica severa. Tales casos se han asociado con cambios electrocardiográficos, miotonía, debilidad muscular, mioglobulinuria, fallo renal y una elevación de la creatina-fosfoquinasa en el suero; todo ello refleja daño en los músculos estriados (14, 21).

El parámetro que permite clasificar a un plaguicida según su toxicidad es la dosis letal media (LD_{50}), que expresa la cantidad de herbicida en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de masa corporal del sujeto capaz de provocar la muerte del 50% de la población de animales de laboratorio utilizada para el estudio. Varias organizaciones han tratado de establecer criterios de clasificación de los herbicidas atendiendo a su toxicidad. La clasificación propuesta por la WHO distingue entre las formas más tóxicas y las menos peligrosas del compuesto técnico presente en las formulaciones comerciales, tomando como toxicidad todos los efectos tóxicos que pueda causar el herbicida, es decir toxicidad aguda, reproductiva y de desarrollo. Dicha clasificación se basa

principalmente en la toxicidad aguda oral y dérmica en ratas (22). La EPA sin embargo, clasifica a los herbicidas en varias categorías, dando categoría 1 a los herbicidas que presentan una toxicidad muy aguda, y 4 a aquellos con toxicidad moderada o nula. Las diferentes categorías de toxicidad se basan en la LD_{50} tanto oral como dérmica, incluyendo además la LC_{50} inhalatoria. La tabla 2 muestra la dosis letal media de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y del herbicida protector objeto de estudio en esta tesis (12, 20).

Tabla 2. Toxicidad expresada como valor LD_{50}

Herbicida	LD_{50} Oral Aguda ($mg\ kg^{-1}$)	LD_{50} Dérmica ($mg\ kg^{-1}$)	LC_{50} Inhalatoria ($mg\ L^{-1}$)	Peligrosidad según WHO (clase)	Peligrosidad según EPA (clase)
	rata	rata	rata		
diclofop	586	1657	-	Moderadamente peligroso (II)	Categoría II
diclofop- metil	581-693	>5000	>1.36		
fluazifop- butyl	>3600	>6050	>5.24	Débilmente peligroso (III)	Categoría III
fluazifop-P	3328	>242	-	Altamente peligroso (1b)	Categoría I
fluazifop-P- butil	2451	-	> 5.24	Débilmente peligroso (III)	Categoría III

2.2.8. LEGISLACIÓN Y CONTROL

En la actualidad, la mayoría de los países poseen algún procedimiento de registro y legislación de herbicidas. Dichos registros permiten a los organismos reguladores ejercer el control sobre el uso, las reclamaciones, el rendimiento, las instrucciones y precauciones, el envasado y la publicidad para asegurar el uso adecuado del herbicida y la protección ambiental y humana (2).

Debido al impacto medioambiental que puede causar el uso de herbicidas, se aprobó la directiva de la UE 76/464/EEC. Dicha directiva, una de las primeras en publicarse en Europa, nacía con el objetivo ambicioso de regular la contaminación potencial causada por multitud de productos químicos, sus productos de degradación y/o transformación en medios acuáticos. Esta directiva está compuesta por dos listas de contaminantes, la primera donde se recogen una serie de grupos y familias de contaminantes procedentes de determinadas sustancias individuales clasificadas en

función de su persistencia, toxicidad y bioacumulación y una segunda dónde se recogen sustancias que tienen un efecto perjudicial sobre el medio acuático (23). Los criterios para incluir un pesticida en una lista prioritaria consisten en determinar si la acción contaminante se produce a niveles cercanos a los de la salud humana. Organismos como la FAO y la WHO, han definido la ingestión diaria aceptable de un compuesto, el nivel permisible y la tolerancia residual, considerando que los residuos presentes en los alimentos no deben sobrepasar los niveles aceptados como inocuos, ni los niveles resultantes de una buena práctica agrícola. Los niveles de residuos de herbicidas por encima de los cuales no se deben consumir los vegetales tratados están controlados mediante los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos en cada país. En ocasiones, los niveles aceptables en un país no los son en otros, por lo que organizaciones internacionales no cesan sus intentos para intentar armonizar los diferentes valores.

La Directiva 76/895/CEE publicada en 1976, es la primera referencia comunitaria y su ámbito de aplicación son las frutas y hortalizas, excluyendo las patatas. Su principal característica es que establece LMRs de grupo, siendo habitual encontrar LMRs que abarcan a todas las frutas o a todas las hortalizas, y dejaba la posibilidad de que los Estados miembros pudiesen permitir, en el ámbito de su territorio, la presencia de productos vegetales con niveles de residuos superiores a los establecidos. Esta directiva fue modificada y ampliada en otras de los años 1980 (80/428/EEC), 1981 (81/36/EEC), 1982 (82/528/EEC), 1986 (86/362/CEE), 1988 (88/298/EEC) y 1989 (89/186/EEC). Todas ellas se referían únicamente a 64 ingredientes activos, por lo que eran las directivas nacionales las que cubrían un mayor número de pesticidas. En 1990 la UE publicó la Directiva 90/642/CEE, diseñada para establecer los LMRs de obligado cumplimiento en materia de exportación, entre países miembros y en 1991 publicó la directiva 91/414/EEC, que hacía referencia a la comercialización de pesticidas. Dicha directiva quedó modificada en 2005 en el Reglamento (CE) nº 396/2005, el cual establecía los niveles máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal (24). Finalmente en 2008 se publicó el Reglamento (CE) N °149/2008 el cual modificaba los límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I del anterior reglamento. Durante los últimos años, dicho reglamento ha sufrido diversas modificaciones, abarcando a un mayor número de plaguicidas, recogiendo la última modificación en el Reglamento (UE) N° 310/2011.

La legislación española establece desde hace más de 50 años que para comercializar un producto herbicida, es necesaria su inscripción en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios. La autorización está precedida por una evaluación toxicológica que determina las precauciones y los riesgos de cada producto para que su empleo no ocasione problemas. En principio, sólo aquellos productos sin problemas en sus aplicaciones, para los consumidores y para el medio ambiente, son autorizados (8). En España los límites máximos de residuos (LMRs) de plaguicidas en productos vegetales (frutas, hortalizas y cereales), vienen establecidos en el Real Decreto 280/1994 (transposición de las Directivas 90/642/CEE, 93/57/CEE, 93/58/CEE y 79/700/CEE). Este valor sólo es aceptado cuando la suma de los posibles residuos en todos los cultivos autorizados es inferior a la Ingestión Diaria Admisible (IDA). En la tabla 3 se muestran los valores de LMRs junto con el número de registro del citado Decreto para alguno de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos (25).

Con respecto a los herbicidas protectores, no existe una legislación a nivel europeo que regule los límites máximos de residuos y solamente algunos países disponen de su propia regulación. En el caso de España, el Real Decreto 280/1994 no recoge los LMRs de esta familia de herbicidas. La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos actualizó en el año 2009 la lista de tolerancias de pesticidas, recogiendo los LMRs para algunos herbicidas protectores como el mefenpyr-dietil en cereales (26) (tabla 4).

Tabla 3. Límites máximos y control de residuos en productos vegetales

Herbicida	Nº registro Real Decreto 280/1994	LMR (mg kg⁻¹) Frutas	LMR (mg kg⁻¹) Hortalizas	LMR (mg kg⁻¹) Cereales	LMR (mg kg⁻¹) Legumbres
diclofop-metil	119	0.02	0.02	0.05	0.05
fluazifop-butil	191	0.20	0.20	2.00	0.05
quizalofop-etil	332	0.02	-	0.02	0.05

Tabla 4. Límites máximos de residuos para el mefenpyr-dietil en algunos cereales

Cereal	LMR (mg kg⁻¹)
Cebada	0.2
Soja	0.1
Trigo	0.2

3. AMINOÁCIDOS

3.1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son las unidades estructurales básicas de las proteínas. Químicamente, son compuestos orgánicos caracterizados por poseer un grupo amino y un grupo carboxílico. Según la posición relativa a la que se une el grupo amino con respecto al carboxilo, los aminoácidos pueden ser α -, β -, γ -, o δ -aminoácidos. Los aminoácidos que forman parte de las proteínas son **α -aminoácidos**, es decir los que su grupo amino permanece unido al llamado carbono- α , denominado así por ser adyacente al grupo carboxilo (fig. 4).

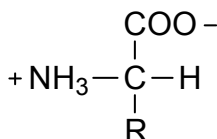


Figura 4. Estructura general de los α -aminoácidos

En la naturaleza se han descubierto más de 700 aminoácidos, siendo la mayoría de ellos α -aminoácidos sintetizados por bacterias, hongos y algas. Únicamente, 20 α -aminoácidos (**19 aminoácidos y 1 iminoácido**) son utilizados por las células para la síntesis proteica, diferenciándose entre sí en el tamaño, forma, carga, capacidad de formar enlaces de hidrógeno, carácter hidrofóbico y reactividad de la cadena lateral R (27-29). Los α -aminoácidos que forman parte de las proteínas se unirán entre sí mediante un enlace covalente entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente denominado enlace peptídico

3.1.1. CLASIFICACIÓN

Los aminoácidos se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios (polaridad, carga eléctrica, afinidad por el agua, actividad óptica, actividad celular o pH).

- **Clasificación en función de la polaridad de la cadena lateral.**

Según la polaridad de la cadena lateral R, los aminoácidos se pueden agrupar en cuatro clases (28, 29):

a) Aminoácidos con grupos R no polares o hidrofóbicos.

Dicha familia contiene cinco aminoácidos cuya cadena lateral es un hidrocarburo alifático (alanina, leucina, isoleucina, valina y prolina), dos cuyo grupo R es aromático (**fenilalanina y triptófano**) y uno que contiene azufre (metionina). Estos aminoácidos únicamente participan en la formación de enlaces mediante fuerzas de van der Waals.

b) Aminoácidos con grupos R polares sin carga

Estos aminoácidos son relativamente más solubles en agua que los que poseen una cadena lateral R no polar, ya que sus cadenas laterales contienen grupos funcionales polares o neutros capaces de formar enlaces de hidrógeno con el agua. Los aminoácidos pertenecientes a esta familia son la serina, treonina y **tirosina** con grupos –OH en la cadena lateral R, la asparagina y glutamina con grupos amídicos, la cisteína con un grupo sulfhidrilo y la glicina con un hidrógeno.

c) Aminoácidos con grupos R cargados negativamente (ácidos)

Los miembros de esta clase son los ácidos aspártico y glutámico. Estos aminoácidos poseen un segundo grupo carboxilo que se halla completamente ionizado, y por tanto cargado negativamente a un pH comprendido entre 6 y 7. Poseen valores de pKa próximos a 5 en solución acuosa, por lo que en general se encuentran en forma no protonada y con carga negativa cuando el pH del medio es 7 (30).

d) Aminoácidos con grupos R cargados positivamente (básicos)

Se denominan aminoácidos básicos a los que poseen grupos R con carga positiva neta a pH 7. Dentro de esta familia formada por la arginina, histidina y lisina, cabe destacar que este último aminoácido posee un grupo amino en posición ϵ de la cadena alifática (29, 30).

- **Clasificación según su esencialidad.**

Los términos **esencial y no esencial** originalmente se definieron en relación con el papel de los aminoácidos en la formación de proteínas y el crecimiento del organismo. Pero tal y como se ha reseñado anteriormente, los veinte aminoácidos expuestos son absolutamente necesarios para conseguir un buen estado de salud. Nuestro organismo posee la capacidad de sintetizar el 80% del total de aminoácidos, mientras que el 20% restante se deben obtener mediante la ingesta directa a través de la dieta; por esta razón los aminoácidos se clasifican en no esenciales o de síntesis endógena y esenciales u obtenidos mediante fuentes externas (31, 32).

a) Aminoácidos no esenciales

Los aminoácidos no esenciales, también denominados en ocasiones prescindibles, son aquellos que un organismo puede sintetizar. Dentro de este grupo se encuentran la alanina, arginina, ácido aspártico y asparagina, cisteína, ácido glutámico y glutamina, glicina, prolina, serina, histidina y tirosina. Todos los tejidos presentan cierta capacidad de síntesis, remodelación e interconversión de aminoácidos, aunque es el hígado el sitio principal de metabolismo del nitrógeno en el cuerpo. Por ejemplo, la tirosina, aminoácido objeto de estudio en esta tesis, es sintetizada a partir del aminoácido fenilalanina y a su vez actúa como precursor de la tiroxina y melanina. (33, 34).

b) Aminoácidos esenciales

Los aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina, valina e histidina se obtienen únicamente a través de la dieta y es por eso se denominan aminoácidos esenciales, o indispensables. Teniendo en cuenta que la metionina es el precursor directo de la cisteína y la fenilalanina de la tirosina, muchos autores consideran que estos últimos aminoácidos también pueden incluirse dentro del grupo de esenciales, ya que la falta de alguno de ellos implica la imposibilidad de síntesis del resto. La ausencia de aminoácidos esenciales en la dieta puede dar lugar a diferentes problemas nutricionales o de salud. (35-38).

El triptófano es uno de los aminoácidos esenciales cuya ausencia conlleva mayores problemas para la nutrición humana, debido a que su carencia es típica en poblaciones que tienen difícil acceso a productos de origen animal, y en las cuales, los

cereales o los tubérculos se convierten en la base de su alimentación (39). Además, tal y como se detallará posteriormente, es el precursor del neurotransmisor serotonina, el cual modula los patrones de sueño y humor y por ello, su deficiencia se ha relacionado con trastornos depresivos. Sin embargo, a nivel nutricional su deficiencia representa un problema mayor ya que es un precursor de la niacina (vitamina B3) y la deficiencia de ambos tiene relación directa con la pelagra, la cual se presenta en poblaciones cuya dieta esta basada en harina de maíz (escasa en este aminoácido) (34).

En cuanto al aporte de estos aminoácidos se consideran factores importantes tanto la cantidad aportada como la proporción de los mismos. La calidad nutricional de una proteína se define como la capacidad de esa fuente para cubrir los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos de un determinado individuo, así, la calidad proteica o valor biológico (VB) viene determinado por la cantidad de aminoácidos esenciales que posee una proteína. A medida que una proteína aporta mayor cantidad de este tipo de aminoácidos y en la cantidad que el organismo necesita, se dice que posee una mayor calidad. En general, las proteínas de origen animal y legumbres poseen alto valor biológico, mientras que cereales y algunos vegetales presentan valor biológico bajo (38).

▪ **Clasificación en función de la capacidad de formación de proteínas.**

Atendiendo a la capacidad de formación de proteínas, los aminoácidos se clasifican:

a) Aminoácidos proteicos

Los aminoácidos **proteicos, canónicos o naturales** son aquellos que están codificados en el genoma. Para la mayoría de los seres vivos estos aminoácidos son los veinte que han sido mencionado anteriormente. Sin embargo, en el código genético de algunos seres existen pequeñas modificaciones que hacen que se puedan codificar otros aminoácidos tales como la selenocisteína o la pirrolisina. Dentro de esta familia, se pueden distinguir dos grupos distintos:

- Codificables o universales. Dentro de este grupo, se recogen los 20 α -aminoácidos proteicos conocidos, tanto esenciales como no esenciales.

- Modificados o particulares. Estos aminoácidos son resultado de modificaciones químicas posteriores a la síntesis de proteínas (39, 40).

b) Aminoácidos no proteicos

Además de los veinte aminoácidos proteicos y de los anteriormente mencionados como poco frecuentes, se conocen unos 150 aminoácidos más que se encuentran en diferentes células y tejidos en forma libre o combinada, pero nunca formando parte de las proteínas. La mayor parte de estos aminoácidos son derivados de los α -aminoácidos proteicos, aunque también son frecuentes los β -, γ - y δ -aminoácidos (28).

c) Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres son aquellos que van a ser incorporados a las diferentes rutas metabólicas. Para ello, las proteínas y péptidos ingeridos sufren un proceso de hidrolización por medio de enzimas proteolíticas (secretadas por el estómago, páncreas e intestino delgado) en el tracto gastrointestinal. Después de la acción de las enzimas los aminoácidos quedan libres y son absorbidos y transportados a la corriente sanguínea por medio de la que llegan al hígado, donde ocurre su metabolismo y distribución. Los aminoácidos libres que provienen de este proceso de digestión de las proteínas son absorbidos por las paredes del intestino y conducidos por medio del sistema porta-hepático. Una vez que llegan al hígado, a través de la corriente sanguínea, son distribuidos por las células para su posterior utilización (28).

3.1.2. PROPIEDADES

- **Propiedades fisicoquímicas**

a) Propiedades físicas

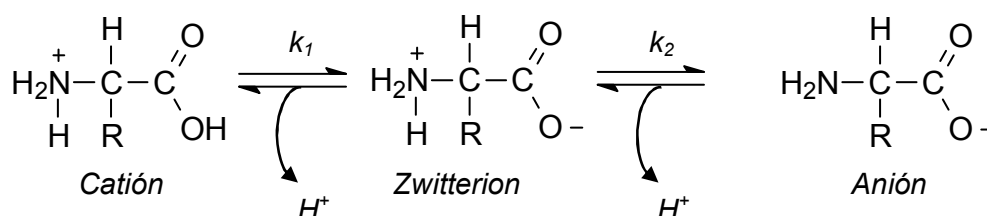
Los aminoácidos en general, son compuestos sólidos de color blanquecino y cristalizables. Salvo excepciones como la valina, se caracterizan por su elevado punto de fusión (habitualmente por encima de los 200 °C) y por su alta solubilidad en agua. Todos ellos hacen girar el plano de la luz polarizada, con valores de poder rotatorio específico positivos (giro dextrógiro) o negativos (giro levógiro) La tabla 5 muestra las

propiedades fisicoquímicas más importantes de los 20 aminoácidos proteicos codificables (41, 42).

b) Propiedades ácido-base

El conocimiento de las propiedades ácido-base de los aminoácidos es importante tanto en la comprensión de sus propiedades, como en el análisis de proteínas, ya que la separación, identificación y valoración cuantitativa de los diferentes aminoácidos se basa en su conducta ácido-base. El estado de ionización de un aminoácido dependerá del pH del medio en que se encuentre. En disolución ácida, cuando existe un exceso de H^+ (a $pH < pK_{a1}$), el grupo amino se comporta como base (aceptor de protones) y la carga neta del aminoácido resulta positiva. A medida que el pH del medio se eleva, el grupo carboxilo es el primero en ceder un protón ya que su pK_a es cercano a 2.

En esta forma de **ión dipolar o zwitterion**, el grupo amino se encuentra protonado ($-NH_3^+$) y el grupo carboxílico desprotonado ($-COO^-$):



La forma dipolar persistirá hasta que el pH del medio sea próximo o superior al pK_{a2} , que es cuando el grupo amino actúa como ácido (dador de protones), resultando negativa la carga neta del aminoácido (43, 44):

El pH al cual el aminoácido no presenta carga neta (las cargas negativas se igualan con las cargas positivas), o lo que es lo mismo la concentración del zwitterion es máxima, se denomina punto isoeléctrico pI :

$$Ec [1] \quad pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

En la tabla 6 se muestran los valores del pK_a de los componentes ácidos y básicos de los aminoácidos a 25 °C, así como sus puntos isoeléctricos (28).

Tabla 5. Propiedades físicas de los veinte aminoácidos proteicos

Aminoácido [CAS RN]	Nombre IUPAC	Fórmula empírica	Masa molecular (g·mol⁻¹)	PF (°C)	Solubilidad agua (g L⁻¹) 25 °C	[α]²⁵_D HCl 5N	Densidad (g·cm⁻³)
Alanina [56-41-7]	Ácido (2S)-Aminopropanóico	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09	296.85	166.5	+14.5	1.401
Arginina [74-79-3]	Ácido (2S)-amino-5-(diaminometilidenoamino) pentanoico	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	243.85	150	+27.6	1.3
Asparagina [70-47-3]	Ácido (2S)-amino-3-carbamoilpropanoico	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.12	234.85	35.3	+28.6	1
Ácido Aspártico[56-84-8]	Ácido (2S)-aminobutanodioico	C ₄ H ₇ NO ₄	133.10	270	7.8	+25.4	1.7
Cisteína [52-90-4]	Ácido(2S)-amino-3-sulfanilpropanoico	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.16	240	280	+6.5	1.34
Fenilalanina [63-91-2]	Ácido (2S)-amino-3-fenilpropanoico	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19	282.85	29.7	-4.5	0.76
Glicina [56-40-6]	Ácido 2-aminoetanoico	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	235.85	225	-	1.607
Ácido glutámico [56-86-9]	Ácido (2S)-aminopentanodioico	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13	199	8.6	+31.8	1.46
Glutamina [56-85-9]	Ácido(2S)-amino-4-carbamoilbutanoico	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.14	184.85	25	+27.6	1.321
Histidina [71-00-1]	Ácido (2S)-amino-3-(1H-imidazol-4-il) propanoico	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.16	286.85	41.9	+11.8	1.14
Isoleucina [73-32-5]	Ácido (2S)-amino-3-metilpentanoico	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	283.85	41.2	+39.5	1.7
Leucina [61-90-5]	Ácido (2S)-amino-4-metilpentanoico	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17	292.85	24.3	-16.0	1.165
Lisina [70-54-2]	Ácido (2S)-6-diaminohexanoico	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19	223.85	642	+25.9	1.16
Metionina [63-68-3]	Ácido (2S)-amino-4-metiltiobutanoico	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21	280.85	33.8	-22.2	1.34
Prolina [147-85-3]	Ácido pirrolidin-(2S)-carboxílico	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13	220.85	162	-60.4	1.35
Serina [302-84-1]	Ácido (2S)-Amino-3-hidroxipropiónico	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09	215	50.2	+15.1	1.603
Tirosina [60-18-4]	Ácido (2S)-Amino-3-(4-hidroxifenil)-propanóico	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.19	290	0.05	-10.0	1.46
Treonina [72-19-5]	Ácido (2S)-amino-3-hidroxibutanoico	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12	265	90	-15.0	0.80
Triptófano [73-22-3]	Ácido(2S)-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.23	227.85	11.4	+2.8	1.34
Valina [516-06-3]	Ácido (2S)-amino-3-metilbutanoico	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15	24.85	88.5	+28.3	1.316

Tabla 6. Valores de pKa y pI de los aminoácidos proteicos codificables

Aminoácido	Valores de pKa			pI
	Grupo $\alpha - \text{COOH}$	Grupo $\alpha - \text{NH}_3^+$	Cadena lateral	
Glicina	2.35	9.78		6.06
Alanina	2.35	9.87		6.10
Valina	2.29	9.72		6.00
Leucina	2.33	9.74		6.04
Isoleucina	2.32	9.76		6.04
Metionina	2.17	9.27		5.74
Prolina	1.95	10.64		6.30
Fenilalanina	2.58	9.24		5.91
Triptófano	2.43	9.44		5.88
Serina	2.19	9.44	>13.00	5.61
Treonina	2.09	9.10	>13.00	5.60
Cisteína	1.86	10.78	8.33	5.02
Tirosina	2.20	9.11	10.11	5.63
Asparagina	2.02	8.80		5.41
Glutamina	2.17	9.13		5.70
Aspartato	1.99	10.00	3.96	2.98
Glutamato	2.13	9.95	4.32	3.08
Lisina	2.16	9.20	10.80	9.47
Arginina	1.82	8.99	12.48	10.76
Histidina	1.81	9.15	6.00	7.64

c) Formación de enlaces metal-aminoácido

Los aminoácidos, pueden actuar como **ligandos mono o bidentados** formando complejos con iones de metales de transición. Los metales divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) se asocian fácilmente a los aminoácidos de las proteínas para formar metaloenzimas (45).

d) Propiedades espectroscópicas

La interpretación de las características espectroscópicas de aminoácidos péptidos y derivados, proporciona información específica sobre su comportamiento en disolución:

- Espectroscopía infrarroja. La frecuencia de estiramiento del grupo carbonilo del enlace peptídico, depende de la conformación del aminoácido.
- Espectroscopía ultravioleta. La espectroscopía de UV es útil para determinar la concentración de proteínas en disolución. Dicha concentración dependerá de la medición de la absorbancia en el máximo a 280 nm y del valor de absorptividad

molar ϵ . Mediante el uso del intervalo de longitudes de onda comprendido entre 240-320 nm, la espectroscopía UV es ampliamente utilizada para determinar las proporciones de los residuos aromáticos en péptidos (tirosina, triptófano y fenilalanina) (46).

- Fluorescencia. En el caso de la tirosina y el triptófano; los rendimientos cuánticos y la cinética de estos procesos dependerán de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el péptido y las medidas de $\lambda_{\text{emisión}} = 315 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{excitación}} = 275 \text{ nm}$ en función del pH del medio, son utilizadas para el conocimiento de la estructura peptídica.
- Dicroísmo circular. Los grupos cromóforos en un entorno quiral como es el caso de los aminoácidos pueden generar espectros de dicroísmo circular (CD) como consecuencia de la absorción de la luz. Aunque el espectro de CD puede ser interpretado en términos de configuración absoluta, el signo de la función de CD (positivo o negativo) se corresponde con una configuración particular del centro quiral más cercano al cromóforo responsable de ese CD (43).

▪ **Reactividad química**

El término reactividad química de aminoácidos engloba la reactividad tanto de la cadena lateral R, como las reacciones dirigidas por el grupo amino y carboxílico. Así las reacciones más importantes son:

a) Pirólisis de aminoácidos

La pirólisis de aminoácidos resulta de especial interés tanto en la industria alimentaria como medioambiental. Los tratamientos a altas temperaturas son importantes en el procesado de alimentos, donde es frecuente la generación de sabores y aromas dependiendo del alcance de esta reacción. En general, cuando los aminoácidos son sometidos a temperaturas de 200 °C se pueden producir algunas roturas de enlaces, reacciones de ciclación, descarboxilación, pérdida de la cadena lateral y formación de aminas, furanos, pirroles y piridinas. Si el tratamiento requiere temperaturas más altas (850-1000 °C) todos los aminoácidos se descomponen totalmente generando ácido cianhídrico (HCN), dióxido de carbono (CO₂) y el hidrocarburo derivado de la cadena lateral (47).

b) Reacciones de los grupos amino y carboxílico.

En general las reacciones típicas del grupo amino como la acilación, la sulfonilación, tioacilación o la N-bencilación son fácilmente reversibles mediante hidrogenación catalítica, aunque también se pueden dar procesos irreversibles como la formación de las bases de Schiff, las N-alquilaciones o las modificaciones o sustituciones parciales o completas del grupo amino. Por otra parte, las reacciones más representativas del grupo carboxílico son procesos fácilmente reversibles, destacando entre ellos la esterificación, la descarboxilación oxidativa, la reducción sucesiva a aldehídos y alcoholes o la formación de halogenuros y otros derivados (48).

3.1.3. FUNCIONES

En general, todos los aminoácidos intervienen en el mantenimiento de los biosistemas y como constituyentes de las proteínas son componentes estructurales de tejidos, células y músculos, promueven el crecimiento y reparación de tejidos y células, contribuyen a las funciones sanguíneas, intervienen en los procesos de síntesis de enzimas digestivas, son constituyentes de las hormonas esenciales para la reproducción y generalmente intervienen en el metabolismo energético.

Adicionalmente, los aminoácidos por sí mismos también son indispensables para que los otros nutrientes sean correctamente absorbidos y metabolizados y son necesarios para un correcto funcionamiento de las vitaminas y de los minerales. Desde un punto de vista funcional, los aminoácidos cumplen con importantes cometidos, entre ellos su intervención en el metabolismo energético o y su acción antiestrés minimizando los efectos nocivos que provocan ciertas enfermedades.

A continuación se especifican las principales funciones en el organismo de algunos aminoácidos (49).

- **Aminoácidos con función antiestrés y antidepresiva**

Ciertos aminoácidos como la valina, leucina, isoleucina, triptófano y fenilalanina parecen tener propiedades antiestrés y antidepresivas, trabajando a nivel de neurotransmisores del cerebro, mejorando así la concentración, el foco mental, la capacidad del cálculo, codificación de la memoria, creatividad, humor, sirviendo de cura y prevención para la mayoría de las depresiones (50).

Dentro de los aminoácidos con marcada función antiestrés y antidepresiva, es importante destacar el papel de los aminoácidos aromáticos. Dichos compuestos juegan un importante papel en el sistema nervioso central ya que todos ellos son compuestos precursores de importantes **neurotransmisores y hormonas**. Además de su eficacia frente a la depresión, la fenilalanina mejora la memoria, posee efecto antimigrañoso y estimula la síntesis de tiroxina por parte de la glándula tiroides, contribuyendo en el mantenimiento del equilibrio mental y del sistema nervioso. La tirosina, bien incorporada a través de la dieta, o bien sintetizada mediante hidroxilación de la fenilalanina, es el aminoácido precursor de la dopamina, norepinefrina y epinefrina, neurotransmisores imprescindibles en el sistema nervioso simpático y de las hormonas de la glándula tiroides (triyodotironina y tiroxina), así como de la melanina de la piel y del cerebro (50, 51). Entre las funciones del triptófano destacan la estabilización del humor, la promoción del sueño y el control del estrés, además de resultar un aminoácido absolutamente necesario para la función digestiva y la correcta utilización de las vitaminas del complejo B. En los años 70, las propiedades antiestrés y antidepresivas del triptófano anteriormente señaladas, convirtieron a dicho aminoácido en una prometedora alternativa a los fármacos comúnmente utilizados en pacientes que presentaban depresión, falta de concentración o trastornos alimenticios (52). El triptófano es el principal precursor de la **serotonina** (3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol) o 5-hidroxitriptamina (5-HT), neurotransmisor con un importante papel regulador en el sistema nervioso central.

La serotonina se localiza en las neuronas, en las células cromafines del intestino y en las plaquetas, participando activamente en los procesos de regulación del sueño, apetito, temperatura, conducta sexual, agresividad y sensación de dolor, relacionándose su déficit con la aparición de depresión y ansiedad (53, 54). En la figura 5 se muestra la biosíntesis de la serotonina.

La vía de síntesis de serotonina se inicia en el mesoencéfalo. El aumento de los niveles de triptófano en el cerebro, provoca una mejora la saturación de la enzima triptófano hidroxilasa haciendo que las células serotoninérgicas formen el producto intermedio de reacción **5-hidroxitriptófano** (5-HTP) mediante hidroxilación del L-triptófano a 5-hidroxitriptófano. La ruta metabólica continúa con la reacción de descarboxilación del 5-HTP catalizada por la enzima 5-HTP-decarboxilasa, la cual utiliza como cofactores el magnesio y la vitamina B6, para dar lugar finalmente a la serotonina (50).

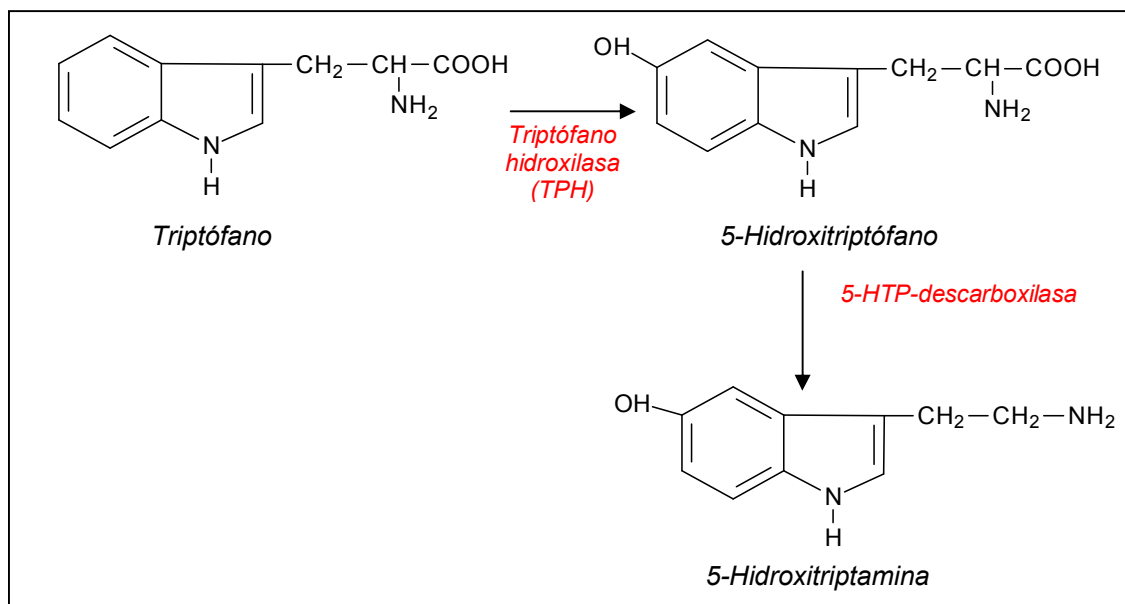


Figura 5. Biosíntesis de la serotonina a partir del triptófano.

Es evidente que el mantenimiento de niveles adecuados de serotonina en el cuerpo es crucial para la salud, ya que proporcionan una sensación de calma, relajación y euforia leve, mientras que unos niveles bajos pueden conllevar a una amplia variedad de problemas mentales y físicos. Es por este motivo que durante años las pastillas de triptófano fueron utilizadas para tratar el insomnio y la depresión y mejorar el estado de ánimo. En 1989 la FDA prohibió todas las ventas de dicho aminoácido debido a la presencia de un contaminante al que se le denominó pico X que provocó un brote de síndrome de mialgia eosinofílica (EMS), un raro trastorno que afecta la piel, sangre, músculos y órganos entre las personas que tomaron dichas píldoras (55).

La biosíntesis de serotonina puede ser acelerada mediante la administración oral de suplementos alimentarios basados en 5-HTP el cual, se incorpora fácilmente en el torrente sanguíneo. El 5-HTP está disponible comercialmente en forma de comprimidos basados en las semillas de la planta *Griffonia Simplicifolia*, utilizados en el tratamiento de una afección conocida como síndrome de mioclonos postanóxico, ansiedad, depresión, insomnio, fibromialgia, migrañas y ciertos trastornos alimentarios como la bulimia (56, 57). Una vez ingerido el 5-HTP, la reacción de descarboxilación de dicho compuesto a serotonina, se da en cualquier célula que contenga un enzima del tipo L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD), pero únicamente las células serotoninérgicas serán las que posean capacidad de almacenamiento y protección de serotonina frente a la acción de la enzima monoaminooxidasa (MAO). La cantidad máxima de ingesta diaria de 5-HTP varía en cada caso, aunque en la mayoría de los

estudios sugieren una administración diaria recomendada de 100–900 mg. Algunos estudios han revelado que el tratamiento con 5-HTP puede ser tan eficaz como cualquier antidepresivo de uso común, mientras que por otra parte algunos autores sostienen que no existe una relación directa entre la ingesta de dichos suplementos y el aumento de los niveles de 5-HTP en sangre (58).

Se demuestra por tanto, que una dieta sana equilibrada y rica en triptófano ayuda a mantener los niveles de serotonina en el cerebro y por tanto a controlar algunos trastornos clínicos como pueden ser la ansiedad, la depresión o los desórdenes obsesivos compulsivos. Puesto que el 5-HTP raramente está presente en los alimentos, la ingesta de alimentos ricos en triptófano propicia la liberación de serotonina (59).

Actualmente existe un creciente interés por el consumo de aquellos alimentos denominados "alimentos de la felicidad o del bienestar", es decir, alimentos que de forma natural elevan el estado de ánimo. Entre todos estos alimentos cabría destacar el chocolate, cuyo consumo se asocia en muchas ocasiones a situaciones relacionadas con la angustia, el estrés o la preocupación. Además del efecto estimulante que proporciona la cafeína, feniletilamina, teobromina y anandamina del cacao, el chocolate contiene grasas que provocan tras su consumo una sensación placentera de saciedad y carbohidratos, que facilitan la absorción y transporte del triptófano en el cerebro. Tras la ingesta de chocolate los niveles de azúcar en sangre se incrementan, estimulando la producción de insulina que hace que las neuronas del cerebro sean más receptivas al triptófano, favoreciendo el transporte del mismo hacia el cerebro y por tanto aumentando así el nivel de serotonina (60). Por otra parte, el chocolate dependiendo del tipo y del contenido en cacao, puede contener pequeñas cantidades de serotonina en concentraciones de unos pocos $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ lo que demuestra además sus propiedades bioactivas y neuroactivas (61).

▪ **Aminoácidos con función promotora del mantenimiento y de la curación**

Algunos aminoácidos como la lisina, treonina y el aminoácido azufrado metionina, participan en el control de las infecciones víricas, fomentando la curación y recuperación en situaciones de infección, resultando además necesarios en el correcto funcionamiento y mantenimiento del organismo.

Otros aminoácidos no esenciales como la arginina y la ornitina presentan una marcada acción detoxificadora, participando en los procesos de eliminación de urea y amonio en situaciones de insuficiencia hepática aguda, relacionándose su deficiencia con el cúmulo de tóxicos en sangre (50).

- **Aminoácidos con función energética**

Algunos aminoácidos como la alanina, GABA, ácido glutámico y glutamina juegan un papel fundamental en los procesos de regeneración muscular, pudiendo actuando como sustrato energético en la contracción muscular durante el ejercicio cuando la intensidad de la actividad es elevada (50).

3.2. AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS

La cantidad de proteínas y por lo tanto de aminoácidos requeridos diariamente en una dieta equilibrada, depende de muchos factores tales como la edad, periodo de crecimiento y estado de salud del individuo. La presencia de aminoácidos esenciales resulta imprescindible, debiendo estar todos ellos presentes en la dieta al mismo tiempo y guardando una relación cualitativa entre sí. En general, en las proteínas de origen animal, la cantidad de aminoácidos esenciales presentes es superior a los presentes en proteínas de origen vegetal.

Por otro lado, no todas las proteínas se digieren y asimilan de la misma manera. El aporte proteico neto dependerá entonces de la relación entre el nitrógeno que contiene y el que el organismo retiene (62).

- **Factores que afectan a la calidad proteica**

El estado nativo de una proteína y por lo tanto su composición aminoacídica, son dependientes del ambiente en el que se encuentre dicha proteína, es decir, cualquier modificación en el pH, la fuerza iónica, la temperatura, etc., conllevará la desnaturalización de la misma, forzando a la molécula a asumir una nueva estructura que en muchos casos podrá provocar la rotura drástica de los enlaces peptídicos. En el caso de las proteínas de los alimentos la desnaturalización puede suponer la pérdida de muchas de las propiedades funcionales, o en algunos casos puede mejorar

en la digestibilidad o disponibilidad biológica de sus aminoácidos (63). Los agentes desnaturalizantes más frecuentes se muestran a continuación:

a) Tratamientos térmicos

El calor es uno de los agentes más frecuentes empleado en la conservación y procesamiento de los alimentos. La composición aminoacídica de las proteínas puede verse afectada según el intervalo de temperaturas utilizado en el tratamiento.

Los tratamientos térmicos moderados efectuados a temperaturas comprendidas entre 70-180 °C inducen a la formación de productos de condensación entre aminoácidos libres y otros compuestos. Así por ejemplo, en tratamientos térmicos a temperaturas próximas a 140 °C, es frecuente la formación de quinolinas, quinoxalinas y piridinas a partir de reacciones de condensación entre la creatinina muscular, los compuestos derivados de la reacción de Maillard y los aminoácidos libres (64). Si los tratamientos térmicos conllevan temperaturas elevadas (300-600 °C) se produce la descarboxilación de los aminoácidos libres, siendo frecuente la aparición de compuestos mutagénicos o carcinogénicos tales como los derivados pirolíticos de algunos aminoácidos como el triptófano (Trp-P1, Trp-P2) o la fenilalanina (Phe-P1) (65).

b) Fermentación y maduración

Los procesos de fermentación, especialmente en productos lácteos (quesos y yogures), implican la acción de ciertos microorganismos encargados de transformar y descomponer sustancias orgánicas complejas en otras más simples. El efecto predominante se debe a la acción de las peptidasas, en concreto la proteasa ácida (endopeptidasa), que se encarga de liberar péptidos de alto y bajo peso molecular y de aminoácidos mediante la degradación de las caseínas alfa y beta, mientras que las exopeptidasas degradan los pequeños péptidos presentes en el medio originando cantidades elevadas de aminoácidos libres (66-69). Los productos generados durante la proteólisis sirven de patrón característico para las distintas variedades de quesos. Por tanto el estudio del perfil de aminoácidos libres en quesos puede ser utilizado como indicador del grado de maduración y calidad de los mismos. Por otra parte, y puesto que la denominación de origen protegida (DOP) de un queso está relacionada con el medio geográfico en el que se produce, transforma y se elabora, y de las materias primas de las que se parte, el estudio del perfil aminoacídico es un método

sencillo para el establecimiento de denominaciones de origen o detección de adulteraciones (70, 71).

c) Cambios de pH

Las proteínas suelen ser más estables frente a la desnaturalización en el pH correspondiente a su punto isoeléctrico. La desnaturalización inducida por el pH suele ser reversible, sin embargo, en algunos casos, cuando el pH del medio es extremo (ácido o básico), algunos enlaces peptídicos se pueden hidrolizar, restos de asparagina y glutamina se desaminan, los grupos sulfhidrilos se destruyen, produciendo en muchos casos la hidrólisis completa de la proteína, lo que conlleva la desnaturalización irreversible de la misma (63).

La determinación de aminoácidos en cualquier tipo de muestra exige una etapa previa de hidrólisis que en muchos casos, se basa en la utilización de un medio con pH extremo utilizado para romper los enlaces peptídicos de la proteína y liberar los aminoácidos que la forman.

Las hidrólisis más frecuentes se basan en la ebullición prolongada de la proteína con soluciones ácidas fuertes (HCl y H₂SO₄). El procedimiento más común y que ofrece los mejores resultados consiste en el calentamiento de la proteína con un exceso de HCl 6 M a ebullición con reflujo y a vacío o bajo atmósfera de nitrógeno a 110 °C durante 24 horas. Mediante este tipo de hidrólisis se destruye completamente el triptófano, parte de la serina y la treonina y existe una degradación por oxidación de la cistina, cisteína, metionina y tirosina. Estos problemas pueden ser solventados, variando la concentración del ácido que se utilice (HCl 3 M o HCl 0.1 M), reduciendo los tiempos de hidrólisis (30 min en vez de 24 horas) o reduciendo la temperatura de trabajo (de 100 a 60 °C) (72). De igual modo, la hidrólisis se puede producir por la ebullición prolongada de la proteína con soluciones básicas fuertes (NaOH). Este método respeta los aminoácidos que se destruyen en la hidrólisis ácida, de ahí que sea uno de los procedimientos frecuentes utilizados en los análisis de triptófano (73), pero provoca con frecuencia la transformación de la forma L- a la D- de los aminoácidos extraídos (74). Para evitar la destrucción de aminoácidos propios de estas hidrólisis se puede recurrir a la utilización de pHs controlados, en los cuales mediante una agitación suave en medio tamponado o antioxidante, los enlaces peptídicos se rompen liberándose los aminoácidos sin destrucción ni transformación de los mismos (75-77).

3.3. CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

Desde el punto de vista práctico la integridad química de cualquier componente de los alimentos y por tanto, de los aminoácidos, puede sufrir modificaciones cuando los alimentos son sometidos a determinados tratamientos, afectando por tanto a la calidad proteica de los mismos. Por otra parte, los alimentos sufren un proceso de degradación natural a lo largo del tiempo, consecuencia de las reacciones fisicoquímicas y de la actividad microbiana que se desarrolla en los mismos. Por tanto, la conservación de un alimento consiste en el bloqueo de la acción de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) o enzimas naturales presentes en ellos, los cuales pueden alterar las características originarias del mismo como son el aspecto, olor, sabor y valor nutricional (78, 79).

Desde hace más de diez mil años existen métodos de conservación que se han ido perfeccionando. La **salazón** es una técnica muy antigua que consiste en añadir sal a los alimentos y dejarlos secar al aire, usada por ejemplo, con el bacalao o con el jamón, y basada en la imposibilidad de supervivencia de los microorganismos en presencia de un exceso de sal. Técnicas parecidas, son el **ahumado** (que se aplica a pescados como el salmón), la conservación en **solución azucarada** (que se utiliza en las mermeladas y en las frutas conservadas en almíbar), el **curado** o el **escabechado**.

En el caso del ahumado, el tratamiento a temperaturas leves y posterior almacenaje del producto, aumenta el contenido de aminoácidos libres sin afectar al contenido de nitrógeno total o a la composición de los mismos (80, 81). Durante el curado de algunos alimentos como el jamón, la proteólisis es la etapa inicial del proceso de maduración, la cual libera gran cantidad de aminoácidos libres indicadores del grado de maduración del producto. Estos aminoácidos están relacionados con el gusto, aroma o sabor. Por ejemplo, la tirosina se asocia al gusto típico de los productos curados o la fenilalanina al sabor salado. La proteólisis excesiva está asociada con la formación de cristales de tirosina o con la aparición de una película blanca típica en del jamón curado envasado al vacío. Por tanto la determinación del perfil aminoacídico, puede ser una alternativa rápida y sencilla en el establecimiento de ciertos criterios de calidad relacionados con el curado del alimento (82-84).

3.3.1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN TRADICIONALES

El gran desarrollo de la industria conservera, la posibilidad de pasteurizar, liofilizar o ultracongelar, ha supuesto un notable avance en lo que se refiere a la conservación de alimentos.

- **Conservación mediante control de temperatura**

Se trata de la destrucción de microorganismos o en la inhibición total o parcial del crecimiento y actividad de los mismos por la acción del calor o por la aplicación del frío.

Con respecto a la utilización de altas temperaturas, existen dos modalidades de tratamiento, la denominada ***pasteurización*** (temperaturas por debajo de 100 °C) con fines de higienización del alimento, y la ***esterilización*** (temperaturas comprendidas entre 110-140 °C) cuyo objetivo es la destrucción de microorganismos que puedan multiplicarse en el producto final. Por otra parte, la aplicación del frío tanto en ***refrigeración*** (0-5 °C) como en ***congelación*** (temperaturas por debajo de -18 °C), permite alargar la vida útil del alimento con mínima repercusión en sus propiedades nutritivas y organolépticas. Si bien, en el caso de algunos alimentos curados como el jamón, la congelación puede producir desnaturalización o agregación de proteínas, modificaciones de textura, color, pérdidas de líquidos y un aumento de proteolisis que se manifiesta en la proliferación de los cristales de tirosina (85).

Estos tratamientos garantizan la seguridad alimentaria, siendo además sencillos y de bajo coste, aunque si el tratamiento es excesivo puede producir una degradación de la estructura del alimento generando sabores u olores extraños (sabor a “cocido”) y pérdida del valor nutricional (78).

- **Conservación mediante modificaciones del pH, atmósfera y actividad del agua**

La acidificación, por su efecto inhibidor del crecimiento de microorganismos, ha sido un tratamiento utilizado desde tiempos remotos. Se puede llevar a cabo de forma natural en los procesos de fermentación como se ha reseñado anteriormente, o adicionando ácidos débiles como el vinagre, típico del escabechado, lo cual hace que

el pH del alimento (próximo a la neutralidad) se acidifique evitando así el crecimiento de la mayoría de bacterias. En algunos encurtidos se ha comprobado que el gran contenido de agua de estos alimentos junto con el proceso de escabechado y fermentado al que son sometidos, inician una proteólisis severa que produce un aumento de algunos aminoácidos libres como la tirosina y la fenilalanina (86).

Las atmósferas modificadas se utilizan principalmente para ampliar la vida útil del alimento, ya que evitan las reacciones oxígeno dependiente típicas en alimentos que se producirían bajo una atmósfera sin modificar. Así por ejemplo bajo atmósferas controladas, modificadas y al vacío se consiguen inhibir los fenómenos de envejecimiento (78). En muchos casos, las concentraciones de aminoácidos libres de los alimentos se modificarán atendiendo al gas o mezcla de gases utilizado en la atmósfera controlada. Mientras que la cantidad de la mayoría de los aminoácidos parece disminuir durante el almacenaje prolongado bajo atmósferas modificadas, la concentración de triptófano suele aumentar (87).

Desde el punto de vista microbiológico la actividad del agua (a_w) refleja el agua disponible por los microorganismos para su crecimiento. A medida que desciende esta actividad, desciende el crecimiento microbiano. Basándose en este aspecto la industria alimentaria aplica dos tipos de tratamientos, la evaporación cuyo fin principal es aumentar la concentración de sólidos totales y así disminuir la a_w , y la deshidratación o desecación que es la extracción deliberada y en condiciones controladas del agua que contiene el alimento (63, 78). En muchos casos, dependiendo de las condiciones y duración de estos tratamientos, el perfil aminoacídico del alimento puede sufrir ligeras modificaciones (88).

3.3.2. TECNOLOGÍAS EMERGENTES DE CONSERVACIÓN

La profunda transformación de los hábitos alimentarios actuales ha provocado que la industria alimentaria transforme alimentos ya procesados (jamón, embutidos, diversos tipos de pescado ahumado, quesos, hortalizas frescas, etc.) en productos **listos para el consumo (RTE)**, lo que implica una reducción del tamaño de presentación (lonchas, filetes, rodajas, piezas pequeñas, etc.). El término de alimento listo para el consumo RTE (*“Ready to Eat”*) según el reglamento europeo CE2073/2005, engloba un gran número y variedad de alimentos destinados al consumo humano directo, que son preparados y comercializados en forma de raciones

familiares (lonchas, cortes, cubos, etc) preparadas a partir de alimentos procesados. Dichos alimentos se almacenan refrigerados hasta su venta y normalmente son consumidos directamente, sin tratamiento posterior (Ej.: lonchas de jamón) o sólo con un procesado mínimo (Ej.: salmón ahumado) (89).

El riesgo de contaminación durante estas operaciones se incrementa, ya que diversos microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli* (O157:H7), *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, generalmente presentes en el entorno, pueden alcanzar el alimento (90, 91). De estos microorganismos patógenos ***L. monocytogenes*** es, quizás, el más preocupante ya que es un microorganismo ubicuo que puede llegar al producto en cualquier momento, se adhiere fácilmente a las superficies de las carnes y otros alimentos y puede sobrevivir en biofilms, consiguiendo así una gran persistencia en los ambientes donde se procesan alimentos; y además es un microorganismo psicrotrofo que puede, por tanto, multiplicarse en los productos RTE durante el almacenamiento bajo refrigeración pudiendo alcanzar niveles peligrosos antes de su venta (92).

Las exigencias de las autoridades sanitarias con respecto a la máxima seguridad microbiológica en alimentos son muy rigurosas, ya que tratan de salvaguardar la salud de los consumidores. La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) en 2004 definió el Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO) como la máxima frecuencia o concentración de un peligro microbiano en un alimento en el momento de su consumo que ofrece el nivel de protección adecuado. Los análisis de estimación del riesgo realizados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) recomiendan una tolerancia cero para *L. monocytogenes* en productos cárnicos RTE, es decir, un FSO de 4 u.f.c./100g. Sin embargo, la ICMSF, teniendo en cuenta todo lo comentado anteriormente con respecto a esta bacteria, concluye que el FSO para *L. monocytogenes* en alimentos RTE se establece en 102 u.f.c./g en el momento del consumo.

Tomando como referencia un alimento RTE altamente consumido como el jamón cocido cuya vida útil en condiciones de refrigeración habitual (5 °C) es de 20 días, se puede producir un incremento medio de la tasa de *L. monocytogenes* de 2.7 unidades logarítmicas. Por tanto, es necesaria la reducción de dicha contaminación mediante la aplicación de cualquier proceso tecnológico para que en el momento de consumo de estos RTE se asegure el correspondiente FSO (90, 93).

Por otro lado la actual búsqueda de alimentos mínimamente procesados pero que a la vez sean seguros y que conserven sus cualidades nutricionales y organolépticas, está promoviendo el desarrollo de nuevas tecnologías en la industria alimentaria que permiten alargar la vida útil de estos alimentos RTE, asegurando el FSO en el momento del consumo y por tanto satisfaciendo la demanda de los consumidores (94). En este aspecto, la tendencia actual es la aplicación de las llamadas tecnologías emergentes en el tratamiento de higienización de alimentos. Dichas tecnologías engloban el uso de radiaciones ionizantes, altas presiones y pulsos de luz, etc., es decir, tecnologías limpias y fácilmente aplicables en las que el alimento no entra en contacto con el exterior y por tanto no es susceptible nuevamente de ser contaminado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cualquier tecnología que se aplique para la elaboración de un producto presenta siempre una determinada agresividad, por lo que surge la necesidad de optimizar dichas tecnologías con el fin de lograr el efecto deseado sin que se produzcan modificaciones en el sabor, color y valor nutritivo del alimento (95).

▪ Aplicación de altas presiones

Los microorganismos y enzimas de un alimento pueden quedar inactivos mediante la aplicación de altas presiones (300-700 MPa) sin producirse alteraciones significativas en las características organolépticas y nutricionales del mismo. La combinación de las altas presiones con temperaturas elevadas, resulta a menudo un tratamiento eficaz a la hora de prevenir el crecimiento microbiano, mejorando significativamente la calidad del alimento.

En España, actualmente se está estudiando la utilidad de dicho tratamiento para la higienización de alimentos RTE como el jamón en lonchas y derivados. Estudios realizados sobre jamón serrano e ibérico, mostraron que tratamientos de 450 MPa durante 10 minutos, redujeron significativamente la población de *L. monocytogenes* sin ningún efecto significativo sobre las características sensoriales y nutritivas de los mismos (96).

▪ Utilización de luz pulsada

La luz pulsada (LP) es una técnica basada en la eliminación de microorganismos mediante la aplicación de pulsos de luz de longitud de onda entre 200 y 280 nm, durante espacios de tiempo cortos. Es una técnica utilizada

tradicionalmente en la eliminación de microorganismos patógenos tales como la *Salmonella* de la superficie de alimentos (Ej: huevos) (97). Dada la rapidez del proceso (menos de un segundo) y a la intensidad del mismo, es una tecnología que se puede instalar perfectamente en las industrias, sin embargo la aplicación de la misma a otro tipo de alimentos es bastante limitada. Los pulsos de luz no presentan poder de penetración suficiente, y por tanto la eficacia descontaminante decrece a medida que aumenta la distancia entre la superficie al centro del envase que contiene el alimento (98).

- **Pulsos eléctricos de alta intensidad**

La utilización de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEF) es una técnica basada en la capacidad que poseen los alimentos de conducir la corriente eléctrica. La inactivación de microorganismos mediante PEF se basa en la rotura de las membranas celulares debido a la distribución irregular de cargas a ambos lados de las mismas. Dicho tratamiento se realiza utilizando campos eléctricos de $50\text{-}80\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$, en impulsos eléctricos cortos. Puesto que el aumento de la temperatura durante el tratamiento no es muy elevado, la pérdida de nutrientes o los cambios sensoriales que se producen durante el tratamiento son mínimos, los aromas, sabores y colores naturales, permanecen prácticamente intactos (99).

- **Microondas, ultrasonidos y campos magnéticos**

Las ondas en la región de las microondas (frecuencias entre 300-30000 MHz) pueden interaccionar con el alimento (de naturaleza tanto sólida, líquida o particulada) manifestándose en forma de calor. Este tratamiento resulta especialmente efectivo en alimentos muy homogéneos en los que el calor se genera de manera uniforme o directamente en alimentos envasados, siempre que la naturaleza del envase permita que este tipo de ondas llegue al producto.

El efecto conservador de los ultrasonidos está asociado a los fenómenos de cavitación gaseosa. Esta acción supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos que no suponen una elevación sustancial de la misma. Sin embargo, la energía liberada sí afecta a la estructura de las células situadas en el entorno.

La conservación de alimentos mediante campos magnéticos supone el tratamiento del mismo bajo un campo magnético oscilatorio de frecuencia comprendida entre 5 y 500 kHz a una temperatura de 0- 50 °C, durante un tiempo total de exposición de 25-10000 µs con un total de 1-1000 pulsos. Generalmente este tratamiento produce un aumento de entre 2-5 °C. Es un tratamiento idóneo para alimentos envasados en materiales flexibles para evitar la contaminación post-proceso (95).

▪ Radiaciones ionizantes

La irradiación de alimentos es un tratamiento físico, no térmico y de alta energía, que se basa en el empleo de radiaciones capaces de producir la ionización y excitación de las moléculas que forman el alimento. Durante el proceso de irradiación los alimentos se exponen brevemente a una fuente de energía radiante: rayos gamma (generalmente ^{60}Co y ^{137}Cs), rayos X o electrones acelerados dentro de una instalación protectora, con el fin de eliminar las bacterias y demás organismos patógenos que puedan alcanzar el alimento. El uso de la irradiación no es reciente sino que se sitúa a finales del siglo XIX cuando se empieza a contemplar la posibilidad de la utilización de la irradiación con fines de conservación. En la década de los años 60 del siglo XX, se descubrieron otros nuevos usos como la desinfección para la eliminación de insectos o la protección contra la germinación de las patatas, y fue en el año 1970 cuando se produjo el primer uso de la irradiación por parte de la NASA para la conservación de la comida que se empleaba en los viajes espaciales.

La irradiación no sustituye la correcta fabricación y manipulación de alimentos pero puede aplicarse con diferentes propósitos entre los que destacan:

- Prevención de germinación y brote de patatas, cebollas, ajos y otras hortalizas.
- Desinfectación de granos, frutas, hortalizas y frutos secos.
- Retardar la maduración y envejecimiento de hortalizas y frutas.
- Prolongación de la vida útil en pescado, marisco, carnes frescas y carnes de aves de corral mediante la destrucción de microorganismos alterantes.
- Eliminación de microorganismos patógenos no esporulados.
- Reducción de microorganismos en hierbas y especias.

Una de las aplicaciones potenciales del tratamiento de los alimentos con radiaciones ionizantes es la destrucción de microorganismos alterantes y patógenos con el fin de ampliar su vida útil o conseguir un producto final seguro.

Debido a la gran radiorresistencia de las esporas de algunos microorganismos como por ejemplo las del *Cl. botulinum*, no parece que las radiaciones ionizantes sean el tratamiento más adecuado para conseguir la esterilidad completa de los alimentos, así su aplicación está restringida a la higienización de alimentos, lo que implica que los microorganismos a tener en cuenta principalmente son los patógenos no esporulados (100).

La dosis de radiación absorbida por el alimento es proporcional a la energía ionizada absorbida por unidad de masa del material irradiado. Los efectos del tratamiento están relacionados con la radiación absorbida, parámetro el cual, es considerado como el más importante en las especificaciones de cualquier proceso de irradiación. La cantidad de energía absorbida por el sistema irradiado se mide en unidades Gray (Gy), que es la unidad equivalente a la cantidad de radiación necesaria para proporcionar una energía media de 100 ergios a un gramo de masa del sistema irradiado (rad), en el Sistema Internacional 1 Gy equivale a un julio/ kilogramo de material irradiado.

La irradiación mediante electrones acelerados se basa en la aplicación de un haz de electrones de alta energía generado por un acelerador lineal. Los electrones acelerados poseen un poder de penetración en los alimentos de tan solo unos pocos centímetros, por lo que dicha tecnología exigirá que el alimento tratado no sea grueso. Hoy en día y debido a este motivo, el uso de este tipo de tecnología parece ser prometedora en la higienización de alimentos envasados listos para el consumo, dónde tal y como se desarrollará más adelante, se ha comprobado que resulta ser bastante eficaz en la eliminación de la *Listeria Monocytogenes* (101). En este tipo de tratamiento la radiación incide sobre el material genético de los organismos patógenos, provocando su destrucción, haciendo que la multiplicación del microorganismo en el alimento no sea posible. El daño en el material genético es el resultado de una colisión directa de la energía radiante y dicho material o como resultado de la ionización de una molécula adyacente de agua. La radiolisis del agua genera iones transitorios (H^+ y $^{\cdot}OH$) capaces de interaccionar con los genes del patógeno.

La radiación puede producir otros efectos en el microorganismo resultantes de la interacción directa e indirecta con las membranas celulares, enzimas y elementos citoplasmáticos. Estas interacciones muchas veces no tienen una acción letal en sí misma, pero son fundamentales para la inactivación del patógeno. La sensibilidad a la radiación de los distintos microorganismos difiere mucho entre sí, pudiéndose ordenar

de la más a la menos resistente como virus > esporas bacterianas > bacterias gram positivas > bacterias gram negativas > mohos > levaduras.

El efecto de la radiación en patógenos va a depender además de las condiciones ambientales bajo las que el organismo es irradiado. El factor ambiental más significativo es la temperatura a la que tiene lugar la irradiación. La letalidad de la radiación ionizante es máxima a temperaturas de congelación y ligeramente superiores. Esta dependencia con la temperatura se debe principalmente al cambio de estado de las moléculas de agua del alimento, es decir, si el agua se encuentra en estado hielo los efectos químicos de la radiolisis cambian, minimizándose los efectos secundarios o indirectos de la radiación, favoreciéndose por tanto la interacción de la radiación con el material genético del patógeno (101, 102).

a) Legislación. Situación actual del uso de la irradiación de alimentos RTE

En la década de los 60 la conservación de alimentos mediante el uso de radiaciones ionizantes empezó a adquirir importancia en varios países entre los que se encontraba España. En nuestro país, en 1966 se dictó el RD (2725/1966), hoy en día traspuesto en el Real Decreto 348/2001, por el que regulaba la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (103). En el mismo año se creaba además la Comisión Asesora de Conservación de Alimentos por Irradiación completando así una serie de estudios de seguridad en alimentos comenzada ya por la FDA., dando como resultado la aprobación del uso de la irradiación para la esterilización de carne de cerdo, desinfectación de trigo e inhibición de brotes en patata. El interés por la radiación aumentó considerablemente durante los años 70, hasta que en 1980 varios organismos internacionales como la FAO, el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la OMS, tras la realización de exhaustivos estudios, determinaron como segura una dosis máxima de radiación de 10 kGy en cualquier producto alimenticio, lo que motivó a la Comisión del Codex Alimentarius a adoptar en 1983 una norma general a nivel mundial para alimentos irradiados, la cual fijaba las condiciones generales para la irradiación de alimentos. La clasificación de las dosis de radiación aplicadas comúnmente en la conservación de los alimentos, según FAO-OMS-OIEA se presenta en la tabla 7

Tabla 7. Clasificación de las dosis de radiación

Propósito	Dosis (kGy)	Productos
DOSIS REDUCIDA (≤ 1 kGy)		
Inhibir germinación	0.05-0.15	Patatas, cebollas, ajos, etc.
Eliminar insectos y parásitos	0.15-0.50	Cereales, legumbres, etc.
Retrasar procesos fisiológicos (maduración)	0.50-1.0	Frutas y hortalizas frescas.
DOSIS MEDIA (1-10) kGy		
Prolongar tiempo de conservación	1.0-3.0	Pescado fresco, fresas, etc.
Eliminar microorganismos alterantes y patógenos	1.0-7.0	Marisco fresco y congelado, carne de aves y de animales de abasto cruda o congelada
Mejorar propiedades tecnológicas del alimento	2.0-7.0	Uvas y verduras deshidratadas
DOSIS ELEVADA (10-50) kGy		
Esterilización industrial	30-50	Carne, aves, mariscos, alimentos preparados, dietas hospitalarias estériles.
Descontaminar ciertos aditivos alimentarios e ingredientes	10-50	Espicias, preparaciones enzimáticas, goma natural.

Sin embargo, a partir de 1980 empezó a generarse cierta desconfianza pública sobre cualquier tratamiento de radiación, lo que provocó que el Comité Científico de Alimentación Humana de la Unión Europea y la FDA emitiesen hasta el año 2003 una serie de informes favorables mostrando la conformidad en la irradiación de ciertos alimentos de uso común como frutas, hortalizas, cereales, tubérculos, especias, frutas, harina de arroz, etc. En la tabla 8, se muestran las dosis de radiación y el fin del tratamiento en ciertos alimentos recogidos en dichos informes (104).

Tabla 8. Usos de la irradiación aprobados por la FDA

Producto	Dosis (kGy)	Propósito	Año
Trigo	0.2-0.5	Desinfección	1963
Patatas	0.05-0.15	Inhibición de brotes	1964
Cerdo	0.3-1.0	<i>Trichinella spiralis</i>	1985
Enzimas	10.0 (max)	Control microbiológico	1986
Fruta y verduras frescas	1.0 (max)	Retraso de la maduración	1986
Hierbas y especias	30.0 (max)	Control microbiológico	1986
Pavo	1.5-4.5	Control microbiológico	1992
Pensos animales	2.0-25.0	<i>Salmonella</i>	1995
Carne empaquetada	4.5-7.0 (max)	Control microbiológico	1997-2000
Huevos	3.0 (max)	<i>Salmonella</i>	2000
Semillas	8.0 (max)	Control microbiológico	2000
Moluscos y mariscos	0.5-7.5	<i>Vibrio, Salmonella, Listeria</i>	2000
Alimentos (RTE)	4.5 (max)	<i>Listeria Monocitogenes</i>	2000
Productos desecados	4.5-10.0 (max)	Control microbiológico	2000

Tal y como se ha reseñado anteriormente, en 2001 en España se aprobó la norma que sigue siendo vigente hoy en día (RD 348/2001) que regula la elaboración, comercialización, elaboración y comercialización-importación de alimentos o ingredientes alimentarios que ha sido tratados con radiaciones ionizantes. La nueva regulación incorpora al derecho español la Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (Directiva marco) y la Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes (100, 104-105). Dicha norma tiene por objeto, entre otros, establecer las obligaciones en relación con el control de los tratamientos, especificando aspectos relativos a las instalaciones radiactivas y los requisitos de autorización, tanto en sus aspectos de seguridad como técnicos (Real Decreto 1836/1999). Por tanto, en España existe una legislación en la que se concretan los productos que pueden tratarse con radiaciones ionizantes, las dosis máximas autorizadas y la fuente de radiación más adecuada en cada caso, aunque en la actualidad los únicos productos en los que la irradiación está permitida son las hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales, para los que se establece un valor máximo de la dosis total media de radiación de 10 kGy. La lista no es cerrada, ya que prevé un procedimiento de solicitud para la inclusión de nuevos productos alimenticios. La autorización de la irradiación de productos alimenticios sólo podrá otorgarse si no presenta riesgos para la salud, supone un beneficio para el consumidor y no se utilice como sustituto de medidas higiénicas y sanitarias, ni de procedimientos de fabricación o agrícolas correctos. En la figura 6 se recoge el etiquetado, de obligado cumplimiento con el que se deben distinguir los alimentos que han sido tratados con radiaciones ionizantes.



Figura 6. Etiquetado establecido para los alimentos sometidos a irradiación

En la actualidad el número de países que permiten el uso de la radiación ionizante con fines higienizantes en algún tipo de alimento o ingrediente alimentario es cada vez mayor. La Decisión 2007/802/CE de 4 de diciembre de 2007 (que modifica la Decisión 2002/840/CE), amplía la lista de instalaciones de terceros países autorizadas para la irradiación de alimentos incluyendo a Tailandia. La Decisión 2010/172/UE de la Comisión de 22 de marzo de 2010 supone una nueva ampliación de la decisión anteriormente comentada (105).

Por tanto, la cuestión que se está planteando en la actualidad, es si el tratamiento con radiaciones ionizantes del producto final una vez envasado, hasta dosis de 10 kGy podría ser apropiado para conseguir una protección eficaz en relación con los riesgos microbianos asociados a la presencia de *L. monocytogenes*. La FDA y la ICMSF determinan que la cantidad de este patógeno en alimentos listos para el consumo que han sufrido un tratamiento térmico (jamón cocido) podría ser de 100 u.f.c. \cdot g⁻¹, pero teniendo en cuenta que *L. monocytogenes* puede multiplicarse durante el almacenamiento bajo refrigeración, sobre todo en alimentos RTE de larga duración, esta cantidad de patógeno podrían aumentar enormemente siendo en el peor de los casos de 10⁶ u.f.c. \cdot g⁻¹. Para evitar este incremento y conseguir el FSO en alimentos listos para el consumo el tratamiento con radiaciones ionizantes con dosis de 10 kGy, sería un tratamiento muy eficaz para realizar 4 reducciones decimales (4D) de la población de *L. monocytogenes*. Estos valores difieren algo de los frecuentemente encontrados en bibliografía que de forma general indican que dosis de 2.5 kGy consiguen el FSO de patógenos esporulados (tabla 8) (106, 107).

En la actualidad, son numerosos los estudios realizados sobre alimentos listos para el consumo que han sido irradiados. En la tabla 9 se muestran los ejemplos más relevantes. Los productos de origen animal, especialmente carnes y pescados, son más sensibles a las radiaciones ionizantes que, por ejemplo, las especias o semillas, y desarrollan más fácilmente olores y sabores anómalos cuando se sobrepasa la dosis umbral (1.75-6 kGy según el tipo de carne). En el caso de carnes curadas por ejemplo, no se ha observado el desarrollo de sabores anómalos cuando el tratamiento se realiza a 2 kGy, sin embargo si las dosis aumenta tan sólo a 4 kGy aparece un sabor y color anómalos (100, 104). A continuación se detallan los cambios más significativos que puede provocar la radiación ionizante en los alimentos:

Tabla 9 .Principales alimentos para el consumo (RTE) tratados con radiaciones ionizantes

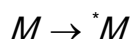
Alimento RTE	Dosis de radiación aplicada (kGy)	Referencia
Jamón cocido en porciones	1 - 8	77, 108
Jamón cocido en porciones	1 y 2.5	109
Jamón serrano en porciones	4.5	110
Lomo curado en porciones	0.5 - 10	111
Jamón cocido y Serrano en porciones, queso en lonchas, salmón ahumado y carne picada prensada tipo "hamburguesa"	1 - 8	112,113
Salchichas tipo "fuet"	1 - 3	114
Queso manchego en lonchas	1 - 4	115
Salchichas cocidas tipo Frankfurt enriquecidas con ácido fólico	2 - 4	116
Salmón ahumado en porciones, queso en lonchas	1 - 8	117
Bandejas de comida preparada	25	118
Hamburguesas de vacuno	5 - 20	119
Bolsas de espinacas listas para servir	0.3 - 1	120
Rollos de carne tipo "kebab"	1 y 2	121
Queso curado en cuñas	1 - 8	122

- *Tasas de radiactividad*

La radiación de alimentos con dosis incluso superiores a 50 kGy, no parece inducir radiactividad en los alimentos sometidos al tratamiento, de hecho un tratamiento a una dosis de radiación de 10 kGy durante 24 horas en alimentos puede mostrar tasas de radiactividad por debajo de los niveles de interés (123).

- *Ionización de moléculas. Efecto primario*

Cuando la radiación ionizante incide sobre el alimento tratado va a provocar que muchas de las moléculas del mismo se ionicen. A este proceso se le suele denominar efecto primario. A consecuencia de este efecto, se generan moléculas excitadas e iones:



- *Reacción con agua*

Como el componente principal de los alimentos es el agua, se generan numerosos productos radiolíticos derivados de la misma destacando, entre ellos, los radicales hidroxilo ($H\cdot$, $\cdot OH$), e_{aq}^- , H_2 , H_2O_2 , H_3O^+ , caracterizados todos ellos por su alta reactividad. Estas moléculas generadas se combinan entre sí y reaccionan con las moléculas vecinas, dando lugar a una cascada de reacciones conocidas como efecto secundario, provocando la formación y desaparición de compuestos, hasta dar lugar a la formación de moléculas químicamente estables. Los efectos primario y secundario se denominan radiolisis y los nuevos productos generados se denominan productos radiolíticos. El resultado final dependerá de la dosis absorbida, de las condiciones, del tratamiento y del tamaño de la molécula sobre la que incide; cuanto mayor es el tamaño mayor será el efecto (101, 102).

- *Efectos sobre los azúcares*

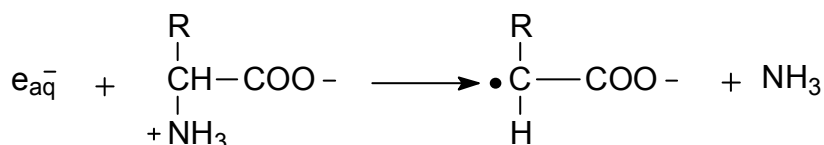
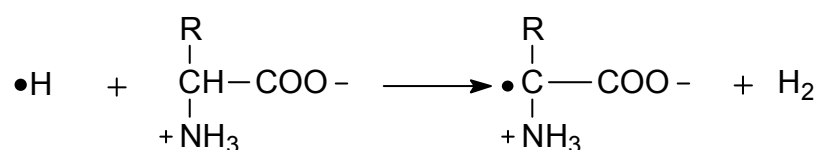
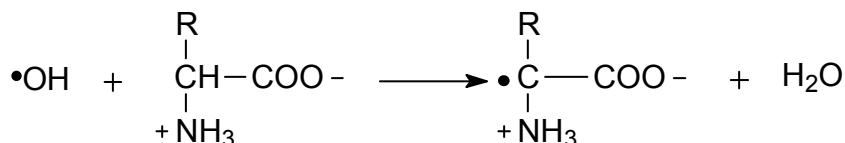
Generalmente el impacto de la radiación en los azúcares de cadena corta (fructosa, galactosa, glucosa y xilosa) provoca una disminución del punto de fusión, un cambio en el poder rotatorio y un ligero cambio de color a parduzco e incluso destrucción de algunos de ellos (124).

- *Efectos sobre las proteínas*

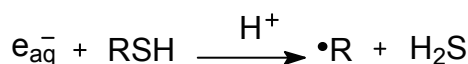
Con respecto a las proteínas, es frecuente que la radiación produzca la rotura del grupo C-N del enlace peptídico, por tanto a medida que aumenta el número de enlaces peptídicos, la proteína será más susceptible de sufrir cambios en su estructura, generándose algunos productos radiolíticos entre los que destacan el amonio, algunos ácidos grasos, cetoácidos y compuestos amínicos y amídicos. Cuando las proteínas son de gran tamaño, la radiación provoca la pérdida en la estructura terciaria y cuaternaria de la misma. Si la proteína es globular, normalmente y dependiendo de la dosis, se produce el despliegue y agregación, mientras que si se trata de una proteína fibrosa, se producirá una degradación de la misma (101, 102).

- *Efectos sobre los aminoácidos*

Aunque algunos autores sostienen que los aminoácidos no se ven alterados significativamente por efecto de la radiación (125), es frecuente que el perfil de aminoácidos libres varíe en función de la dosis de radiación, ya que muchos aminoácidos son especialmente sensibles a dicho tratamiento. Los aminoácidos más simples como la alanina, reaccionarán con los radicales formados en la radiolisis del agua:



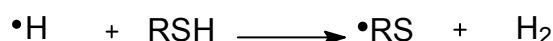
Los radicales formados pueden reaccionar fácilmente entre ellos generando diaminoácidos. Dependiendo de las dosis de radiación y de las condiciones en las que se lleve a cabo el tratamiento, los productos que se formen pueden ser distintos. Se ha comprobado que en atmósferas libres de oxígeno y a un pH próximo a la neutralidad, aplicando una radiación gamma a una dosis de 10 kGy puede provocar la destrucción de los aminoácidos más simples, generando ácido pirúvico y propiónico, amonio, dióxido de carbono, acetaldehído, etilamina, hidrógeno y pequeñas cantidades de metano. Sin duda los aminoácidos más susceptibles a la radiación son los azufrados y los aromáticos. Aquellos que poseen azufre en su estructura, reaccionan más rápido con los radicales libres, por lo que, en cierto modo actúan como protectores de otros aminoácidos. Si tomamos la cisteína por ejemplo (RSH) las reacciones que se producen son las siguientes:



Radical alanina + sulfuro de hidrógeno



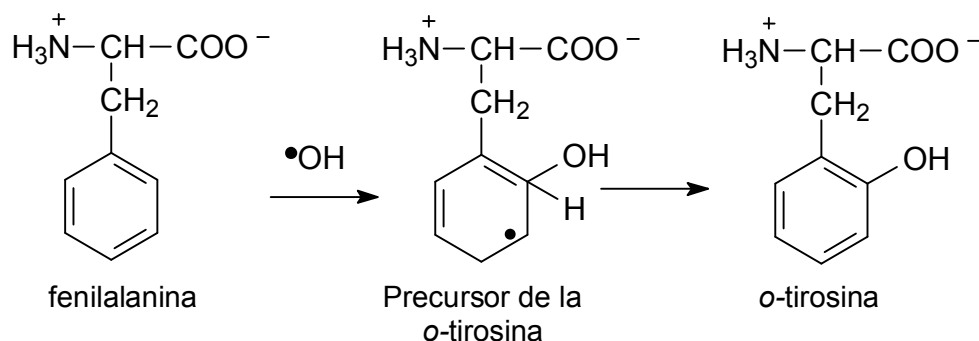
Radical cisteína



Radical cisteína

Los radicales formados pueden seguir reaccionando, generando productos extremadamente estables como la cistina, alanina, hidrógeno o sulfuro de hidrógeno. Cuando la irradiación incide sobre la metionina, las reacciones que se producen son similares, sin embargo, uno de los productos de reacción es el mercaptano responsable de los olores y sabores desagradables en alimentos (102).

Con respecto a los aminoácidos aromáticos, la irradiación principalmente contribuye a la hidroxilación del anillo aromático. Cuando la irradiación incide sobre la fenilalanina, y esta se encuentra en un ambiente acuoso (alimento con gran contenido en agua), tendrá lugar la reacción de hidroxilación debido a la acción del radical hidroxilo en diferentes posiciones del anillo aromático dando como principales productos de reacción la *orto*-, *meta*- y *para*-tirosina:



Esta reacción ha sido sugerida por muchos autores como reacción indicadora de productos que han sido sometidos a reacciones ionizantes (126).

El triptófano es considerado como el aminoácido más reactivo frente a la radiación. En alimentos con alto contenido proteico, la formación de los isómeros

hidroxilados del triptófano (4, 5,6, y 7-OH-Trp) es proporcional a la dosis de radiación aplicada (127, 128).

Son numerosos los ejemplos presentados en la bibliografía que se recogen la variación del perfil aminoacídico en alimentos irradiados. Por ejemplo en formulaciones infantiles sometidas a irradiación gamma (0.5–50 kGy) se observaron cambios, aunque no muy significativos, en el contenido de algunos aminoácidos como los azufrados o la histidina (129). En estudios realizados sobre alimentos listos para el consumo (RTE), como jamón cocido y serrano, queso en lonchas, carne picada o salmón ahumado, tratados con electrones acelerados (112) muestran disminución de la Phe, Tyr, y Trp a partir de distintas dosis de radiación y aparición de los isómeros *o*-y *m*-Tyr y 5-OH-Trp. Este fenómeno también ha sido observado cuando la irradiación se ha llevado a cabo en pescados utilizando radiación gamma a dosis de radiación comprendidas entre 2.5-5 kGy (130). Algunos autores sostienen que la irradiación puede formar a partir del triptófano libre, algunas γ -carbolinas como la Trp-P-1 y Trp-P-2 (134). Estudios sobre carne de pollo y pescado irradiado, han señalado que este tratamiento puede producir la descarboxilación de la tirosina y el triptófano produciendo aminas biogénicas de gran toxicidad (126,130). Sin embargo, no se han detectado la formación de aminas heterocíclicas en jamón cocido, queso en lonchas y salmón ahumado tratados con electrones acelerados (108, 117).

- *Efectos sobre las grasas*

Cuando la radiación ionizante incide en las grasas la degradación puede ocurrir por varias vías, bien la grasa reacciona con uno de los radicales libres previamente formados, o se forman radicales reactivos a partir de los propios triglicéridos que reaccionan entre sí. En cualquier caso, el resultado de ambas vías es la destrucción de ácidos grasos, el enranciamiento de la grasa y la formación de volátiles (102). Muchos autores han sugerido que realmente el olor descrito como “grasa caliente” o “aceite quemado” que presenta, por ejemplo, el pollo cuando es irradiado a 3 kGy, es producido principalmente por el proceso conjunto de oxidación lipídica y proteica y la interacción de compuestos volátiles generados (aldehídos y cetonas) con algunos aminoácidos (111, 131).

- *Efectos sobre los aditivos*

Algunos aditivos alimentarios como los nitratos y nitritos son tradicionalmente utilizados como conservantes en la curación de la carne (63) y en productos de pescado que han sido ahumados en caliente (132). Los nitritos pueden reaccionar con sustancias que contengan nitrógeno (como aminoácidos y aminas secundarias) formando nitrosaminas, compuestos potencialmente cancerígenos (133-134). En estudios realizados sobre jamón serrano y jamón cocido, la irradiación en ambos casos parece disminuir el contenido de nitrito y nitrato respectivamente de forma proporcional a la dosis aplicada, lo que puede indicar una generación de nitrosaminas en estos productos (113).

- *Cambios organolépticos*

La magnitud de los cambios organolépticos inducidos por la radiación depende principalmente de la dosis absorbida. Parece ser que existe una dosis umbral por debajo de la cual los cambios no son detectables, mientras que dosis elevadas de irradiación causan modificaciones del sabor, color y textura que pueden hacer al alimento inaceptable. La irradiación de la carne fresca, incluso a dosis bajas, puede dar lugar a malos olores y sabores que se han descrito en bibliografía como a “huevo podrido”, “azufre”, “metálico”, etc. Estos olores variarán dependiendo del tipo de carne, de la dosis de radiación de la presencia o no de oxígeno y del tipo de envase del alimento (115, 135). Los cambios de color en la carne irradiada se deben principalmente a la incidencia de la radiación en la molécula de mioglobina y a la capacidad del hierro de permanecer en distintos estados de oxidación. Si la irradiación se lleva a cabo en una atmósfera que contiene oxígeno, es frecuente la aparición de grandes cantidades de metahemoglobina que proviene de la oxidación acelerada de la mioglobina. En cambio si la irradiación tiene lugar en un ambiente antioxidante, puede aparecer en el alimento ligera pigmentación verde debido a la destrucción de la porfirinas y formación de la sulfomioglobina (136). En el caso de alimentos listos para el consumo como el jamón cocido o las salchichas, la aparición de colores y sabores asociados a la irradiación empiezan a aparecer a partir de una dosis de radiación de 2 kGy (109, 114). En el caso del salmón ahumado, haciendo una comparativa del tratamiento mediante radiaciones ionizantes y altas presiones se establece que en el caso de radiaciones ionizantes, el FSO se puede conseguir con dosis de 2 kGy con cambios muy ligeros en el olor y color. Aplicando una presión de 450 MPa, se consigue el mismo efecto pero parece que la textura del producto resulta más ligera y los cambios de color son más acusados (137).

4. QUIRALIDAD

4.1. PRINCIPIOS GENERALES

El término **quiralidad** (del griego “*kheir*”, “*mano*”) se utiliza para describir una propiedad de un objeto que no presenta ninguna forma de simetría lo que hace que no sea superponible con su imagen especular. Esta presencia de asimetría es un hecho que se da de forma muy frecuente tanto en la química, como en la biología y juega un papel muy importante en multitud de procesos. La naturaleza, siempre va a mostrar preferencia por una de las dos formas enantioméricas, fenómeno al que se le conoce como homoquiralidad biológica (138). Cuando el término quiralidad es usado en el ámbito de la química, dos moléculas que no son superponibles se denominan **enantiómeros** o isómeros ópticos, ya que desvían la luz polarizada en distintas direcciones. El primer indicio de comprensión de la actividad óptica apareció en 1848, cuando el químico francés Louis Pasteur (1822-95) empezó a trabajar con cristales de ácido tartárico ($C_4H_6O_6$) observando que los cristales o soluciones de un isómero (cristal con orientación levógira) rotaban la luz polarizada en una dirección, mientras que el otro isómero (cristal con orientación dextrógira) rotaba la luz en dirección opuesta (139).

Otro aspecto muy importante en relación a la quiralidad es el relativo a la actividad de los enantiómeros. Aunque estos presentan prácticamente las mismas propiedades físicas y químicas, no ocurre lo mismo con su actividad biológica cuando intervienen en procesos naturales. Así, en compuestos naturales quirales sólo uno de los enantiómeros es sintetizado o puede ser metabolizado por los organismos, por ejemplo todos los azúcares naturales son de la serie D -, siendo excepcional la existencia de azúcares naturales de la serie L-. En el caso de los aminoácidos, únicamente el isómero L- y no el D- forman parte de las proteínas. En estos casos, como solo uno de los enantiómeros tiene actividad biológica, el otro no deja de ser una sustancia extraña por lo que en muchos casos pueden provocar en los organismos efectos no deseados, como toxicidad, mutagenicidad, etc. (48).

Lo mismo ocurre con las sustancias xenobióticas quirales, es decir, aquellas sustancias no naturales que interaccionan con los organismos vivos, como productos farmacéuticos, agroquímicos, aditivos alimentarios, etc. Aquí el comportamiento de

cada enantiómero puede llegar a ser totalmente diferente. Situación similar se da en el caso de los productos agroquímicos, donde muchos de los insecticidas y herbicidas presentan quiralidad. Como en el caso de los fármacos, la actividad biológica de los enantiómeros puede llegar a ser muy diferente, y por lo general solamente una de las formas enantioméricas es activa biológicamente y actúa como pesticida, mientras que la otra puede ser tóxica para muchos microorganismos involucrados en su degradación medioambiental o no activa, lo que hace que permanezca mucho más tiempo en el entorno contaminando el medioambiente (140).

4.2. QUIRALIDAD EN HERBICIDAS

Uno de los grandes problemas de la síntesis química de pesticidas en general, es la posibilidad de generación de centros estereogénicos, lo que hace que más del 25% de los mismos sean quirales. De cualquier manera, dichos productos se manufacturan y se aplican como mezclas racémicas con las mismas cantidades de ambos enantiómeros, lo cual puede tener varias repercusiones:

- La transformación biológica de un contaminante quiral puede ser estereoselectiva, y por tanto, el metabolismo y la excreción de los enantiómeros puede ser diferente.
- Los enantiómeros de un contaminante quiral pueden tener distinta toxicidad. En el caso de los productos agroquímicos la actividad biológica de los enantiómeros puede llegar a ser muy diferente, y por lo general, sólo una de las formas enantioméricas es activa biológicamente y actúa como pesticida, mientras que la otra puede ser tóxica para muchos microorganismos involucrados en su degradación medioambiental o no activa.
- Los enantiómeros pueden reaccionar de diferente manera con moléculas aquirales en presencia de un catalizador quiral. Esto es lo que ocurre en el caso de las enzimas en las que las diferencias en la bioafinidad de cada uno de los enantiómeros por la superficie o centro activo de la enzima, hacen que el anclaje y posterior reacción de cada uno de los enantiómeros sea distinta.
- Los cambios ambientales pueden inducir la transformación preferente de uno de los enantiómeros del contaminante quiral (140, 141).

Los ejemplos de herbicidas que son aplicados en forma de mezcla racémica y en los que la actividad de sus enantiómeros es distinta entre sí son muy numerosos.

En el caso de los herbicidas fenoxiácidos, el isómero activo, por lo general, es el isómero R-(+). Así, el **enantiómero R-(+)** del herbicida diclorprop es activo y elimina las malas hierbas, mientras que el **isómero S-(-)** presenta escasa o nula actividad. En otros casos, el enantiómero R-(+) suele ser degradado por los microorganismos, mientras que el enantiómero S-(-) permanece inalterado durante tiempos largos como ocurre con el 2,4-DP, o el MCP. Algunos herbicidas organofosforados también presentan toxicidad enantioselectiva, por ejemplo, el enantiómero R del malatión presenta una capacidad de inhibición de la enzima colinesterasa eritrocitaria de la especie bovina, 22 veces superior a la del enantiómero S. (140, 142).

▪ Quiralidad en los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos

Estos herbicidas (figura 7) forman parte de numerosas formulaciones comerciales, en la mayoría de los casos en forma de racemato, es decir cada isómero esta presente en una proporción del 50%. Sin embargo, al igual que ocurre en otro tipo de herbicidas, uno de los isómeros presenta mucha mayor actividad que el otro. En este caso, el isómero R-(+) del diclofop-metil (y diclofop ácido), quizalofop-etil y fluazifop-butil, es el que presenta una actividad significativamente mayor que la del isómero S-(-).

Por otra parte, también presentan degradación estereoselectiva. Así por ejemplo, en algunos suelos debido a la acción de los microorganismos, se ha observado que el isómero S-(-) se disipa más lentamente que el R-(+) (143). Esta velocidad de degradación a veces depende del entorno dónde se encuentra el herbicida. En este sentido se ha podido constatar que el isómero S-(-) del mismo herbicida presenta una tasa de degradación muy superior a la del isómero R-(+) cuando se determina en coles (144), mientras que, en repollo, aunque la situación es análoga para el diclofop-metil, la tasa de degradación de los enantiómeros del diclofop-ácido no presenta diferencias significativas entre ellos (145). Situación análoga ocurre con el quizalofop-etil y su principal metabolito quizalofop-ácido. El resultado de la degradación de estos herbicidas dependerá de las propiedades ambientales, por ejemplo en aguas el quizalofop-etil se degrada casi en su totalidad a quizalofop-ácido y sin mostrar ninguna enantioselectividad. Sin embargo, si en el medio conviven algas, los receptores quirales de estas hacen que la degradación de estos herbicidas sea en cierto grado estereoselectiva (146).

Dentro del grupo de los herbicidas protectores, el benoxacor, diciclon, furilazol y mefenpyr-dietil presentan actividad óptica. En este caso la actividad de los enantiómeros puede ser también muy distinta. Por ejemplo, el enantiómero S-(-) del benoxacor presenta mayor actividad que el enantiómero R-(+) y sin embargo en el caso del mefenpyr-dietil, la situación es contraria; el enantiómero R-(+) presenta mayor actividad que el enantiómero S-(-) (147). En consecuencia, el empleo de mezclas racémicas de estos compuestos introduce un 50% de herbicida adicional en el medioambiente y produce una mayor contaminación.

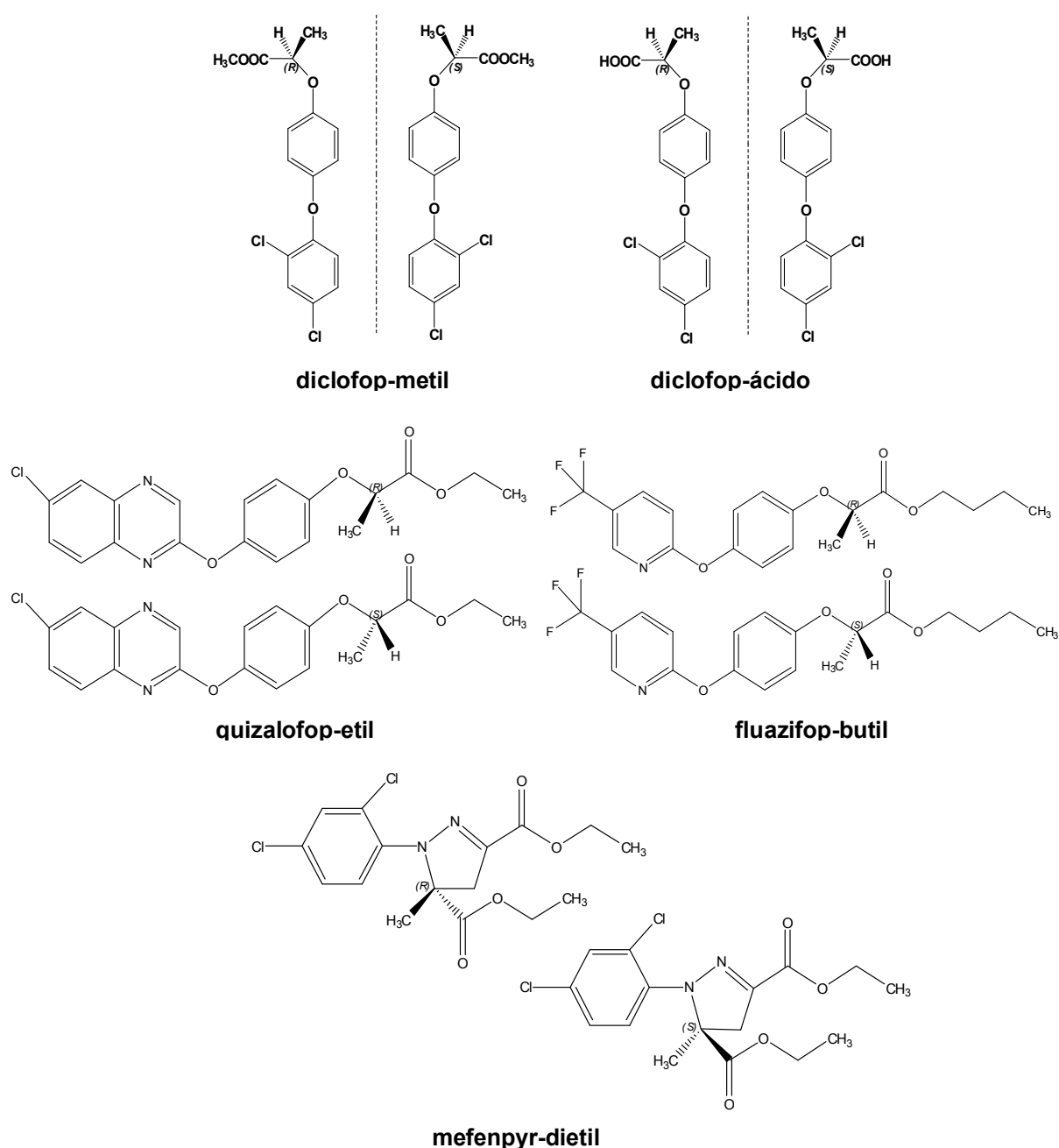


Figura 7. Estructura de los enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos estudiados

Por ello, y atendiendo a la diferente toxicidad de los isómeros ópticos, algunos países europeos, como Suiza y Holanda, han restringido la producción de algunos herbicidas como MCPP al enantiómero puro activo, por lo que en estos países, desde hace más de una década, únicamente se pueden comercializar formulaciones ópticamente puras. Por otra parte, Suecia ha puesto en marcha un impuesto sobre los productos agroquímicos basado en el peso del ingrediente activo. En lo que se refiere a España aún no se ha adoptado legislación similar. En España, en general, las regulaciones ambientales basadas en estudios toxicológicos, recogen los LMR del herbicida como forma racémica y no referidos a cada uno de sus enantiómeros. Dentro de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, únicamente para el haloxyfop-metil, los LMR están recogidos para el isómero R-(+) Dentro del marco de la normativa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) se establece que en el caso del uso continuado de sustancias de alto peligro ("substance of very high concern" SVHCs), como es el caso de algunas de los agroquímicos mencionados anteriormente, los importadores y los productores están obligados a investigar los efectos de estos enantiómeros en la salud humana y en el medio ambiente (8, 140).

4.3. QUIRALIDAD EN AMINOÁCIDOS

A excepción de la glicocola, todos los aminoácidos obtenidos a partir de la hidrólisis de las proteínas en condiciones suaves muestran actividad óptica, es decir, pueden hacer girar el plano de la luz polarizada cuando se examina en un polarímetro. Las dos formas especulares objeto-imagen no superponibles se denominan **isómero L** e **isómero D** (figura 8), refiriéndose esta nomenclatura a la configuración absoluta y no a la dirección de la rotación.

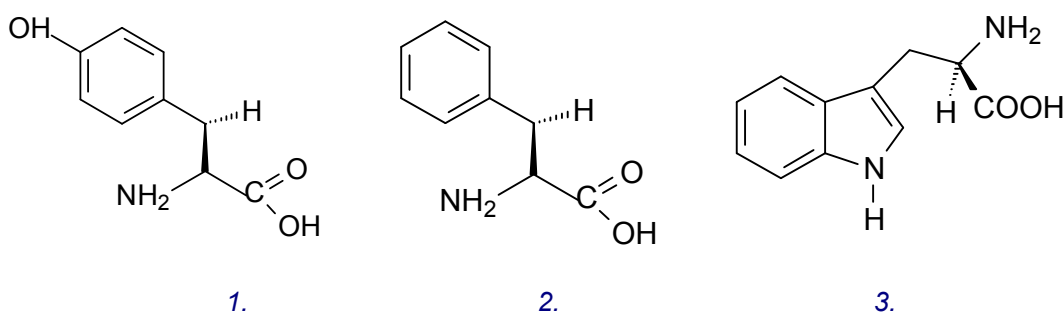


Figura 8. Isómeros L- de la 1. tirosina, 2. fenilalanina, 3. triptófano

Los isómeros L y D de un aminoácido poseen propiedades físicas y reactividad química idénticas diferenciándose entre si en que ambos enantiómeros hacen girar el plano de polarización de la luz igualmente pero en direcciones opuestas y en la diferente velocidad de reacción frente a reactivos asimétricos y enzimas (29).

Todos los aminoácidos que aparecen en la naturaleza y que forman parte de las proteínas pertenecen a la serie estereoquímica L. Muchos D-aminoácidos diferentes están presentes en las células vivas de algunos organismos, por ejemplo, en las paredes de algunos microorganismos o formando parte de la estructura de antibióticos peptídicos, proteínas de caracoles o como componente de peptidoglucano en eubacterias.

Las principales fuentes de D-aminoácido en humanos son el consumo de alimentos y bebidas y las degradaciones producidas por microorganismos en las paredes del intestino. Sólo entre el 10-20 % de los D-aminoácidos ingeridos son excretados mientras que el 80-90 % restante es absorbido en el intestino y metabolizados en α -oxoácidos por la D-aminoácido oxidasa. La acumulación de D-aminoácidos en el organismo, resultante de la baja actividad de la D-aminoácido oxidasa o del reducido grado de degradación de los péptidos que los contienen, puede tener graves implicaciones toxicológicas en el organismo, incluso aquellos que poseen funciones esenciales en sistemas vivos (D-serina o el D-ácido aspártico), que actúan como neuromoduladores (148). Por ejemplo, los enfermos renales presentan altas concentraciones de D-aminoácidos en saliva y orina (149) y los enfermos de Alzheimer o esquizofrenia (150) cantidades elevadas de D-alanina.

La formación y presencia de D-aminoácidos en alimentos puede ser debida a varios factores:

- La presencia de D-aminoácidos puede estar relacionada con algunas tecnologías de procesamiento de alimentos especialmente si implican altas temperaturas, como por ejemplo el tostado del café (151) o la extrusión del maíz (152) y en procesos de agitación mecánica (153). Sin embargo otro tipo de tecnologías como las radiaciones ionizantes, no provocan racemizaciones significativas en los aminoácidos de alimentos listos para el consumo (RTE) (77,112).
- Los D-aminoácidos también pueden formarse bajo la acción de algunas bacterias como el *Streptococcus thermophilus* (154), o de algunas levaduras implicadas en el proceso de elaboración de la cerveza o vino (155, 156), de

ahí que sea frecuente encontrar ciertas cantidades de D-aminoácidos en comidas fermentadas como el yogurt o el kéfir (157, 158), quesos maduros (159, 160), vinagres (161) o salsas (162).

- La aparición de D-aminoácidos, puede ser asociada, también, a tratamientos de fuertes de hidrólisis de proteínas (72) tales como calentamiento con bases fuertes o con ácidos fuertes, que pueden hacer pasar al centro estereogénico a través de un estado simétrico intermedio provocando racemizaciones leves.
- Algunos zumos comerciales, especialmente de naranja, uva y pera (163, 164) pueden contener cantidades significativas de D-aminoácidos debidas a la adulteración, en algunos casos, o a la mala calidad de las frutas utilizadas en su elaboración, en otros. Situación similar ocurre en las mieles donde la detección de D-aminoácidos se utiliza para determinar la duración del almacenamiento y la naturaleza del proceso de producción (165).
- El empleo de organismos genéticamente modificados (OGM) en la industria alimentaria. En alimentación, destaca el uso de levaduras transgénicas para mejorar las propiedades de los vinos espumosos. Durante el envejecimiento las células de la levadura mueren mediante autólisis, liberando péptidos y aminoácidos, proceso en el cual es posible la formación de D-enantiómeros (166).

Por tanto, la presencia de D-aminoácidos puede llevar a una dieta más pobre en nutrientes y a productos menos seguros desde un punto de vista toxicológico. Atendiendo a lo expuesto, la detección de D-aminoácidos en alimentos puede ser utilizada como indicador de la calidad de los mismos, para valorar el grado de fermentación, detección de adulteraciones, contaminaciones microbiológicas, o regular el uso y comercialización de algunos tipos de alimentos.

5. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS Y AMINOÁCIDOS

Tradicionalmente la determinación de algunos herbicidas ariloxifenoxipropiónicos como el diclofop-metil, se ha efectuado mediante **métodos colorimétricos y espectrofotométricos** (167), resultando ser métodos sencillos, y rápidos para evaluar la cantidad total de dicho herbicida. Sin embargo este tipo de determinaciones no alcanzaban las sensibilidades requeridas y no permitían la determinación simultánea de los compuestos originales y sus metabolitos o productos de degradación.

La determinación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos se ha llevado a cabo mediante técnicas cromatográficas principalmente, tanto **cromatografía de líquidos (LC) como de gases (GC)**, acopladas a una gran variedad de detectores, siendo el de ultravioleta (UV), y de hilera de diodos (DAD) los más ampliamente utilizados como detectores clásicos en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 210-280 nm, aunque a estas longitudes de onda muchos compuestos orgánicos e inorgánicos pueden absorber, ser detectados e interferir con la detección de los herbicidas. En la actualidad la determinación de estos herbicidas a niveles traza en aguas potables, suelos, alimentos, se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas (MS), permitiendo alcanzar la sensibilidad y selectividad requerida para el análisis, separando y determinando simultáneamente los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos junto con otros herbicidas utilizados normalmente en combinación en numerosas formulaciones comerciales (168).

Aunque la cromatografía convencional únicamente es capaz de determinar mezclas racémicas, igual de interesante resulta la separación y determinación de los distintos enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos que, como ya se ha comentado, presentan propiedades biológicas y toxicológicas diferentes.

En cuanto al análisis de aminoácidos hoy en día, el control de calidad de alimentos, su valor nutricional y el control de residuos en los mismos se ha convertido en un campo de elevado interés social. Los aminoácidos resultan un parámetro de interés a analizar dentro del campo de la evaluación del valor nutricional de alimentos y bebidas, seguimiento de fermentaciones y otros procesos tecnológicos, etc.

Desde 1958 la determinación de aminoácidos se ha llevado principalmente mediante técnicas cromatográficas, utilizándose con mayor frecuencia la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de gases mediante detección con ionización en llama (FID), o la cromatografía de líquidos con detección UV fluorescencia o masas. En la mayoría de los casos, para mejorar la sensibilidad del análisis cromatográfico, se requieren procesos de derivatización, sin embargo, aunque estos proporcionan buena sensibilidad, en muchas ocasiones se llevan a cabo en condiciones en las que la reacción con algún aminoácido no es completa o incluso llega a ser nula (169).

Al igual que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, el análisis quiral de aminoácidos también adquiere importancia relevante ya que en general, únicamente el isómero L- de los aminoácidos formará parte de las proteínas naturales. Aunque la cantidad de D-aminoácidos presentes en los alimentos es significativamente menor que la de L-aminoácidos, su presencia puede llevar a una dieta más pobre en nutrientes y a productos menos seguros desde un punto de vista toxicológico, por lo que la detección de dichos aminoácidos en alimentos puede ser utilizada como indicador de la calidad de los mismos.

Puesto que en esta tesis se ha llevado a cabo separaciones tanto **quirales** como **quirales** de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos, la revisión bibliográfica se centrará únicamente en métodos analíticos de separación.

5.1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN NO QUIRALES

5.1.1. MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

El gran potencial de las técnicas cromatográficas para llevar a cabo determinaciones multianalito, su especificidad, precisión exactitud, reproducibilidad y sensibilidad, han supuesto su implantación como métodos de análisis rutinario y métodos oficiales validados utilizados en la detección de residuos de herbicidas y aminoácidos en distintos tipos de matrices (170).

La cromatografía en capa fina (TLC) fue muy utilizada entre 1960 y 1970 y en algunos casos más recientes, se ha utilizado como una herramienta económica de diagnóstico, “screening” o seguimiento de la pureza de algunas separaciones

cromatográficos para algunos herbicidas ariloxifenoxipropiónicos como el diclofop-metil y el diclofop-ácido, fluazifop-butil y fluazifop (171, 172). Sin embargo, en análisis de aminoácidos la cromatografía en capa fina, posee una posición privilegiada debido a su simplicidad, rapidez, y bajo coste, siendo la solución en muchos casos para diagnósticos rápidos, o seguimiento de algunas rutas metabólicas en las que intervienen dichos analitos. La separación de aminoácidos mediante TLC, se ha llevado a cabo tradicionalmente en gel de sílice y celulosa utilizando como eluyentes mezclas de metanol/agua en distintas proporciones y reacción con ninhidrina para su posterior detección (173).

5.1.1.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Las primeras determinaciones de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía de gases se llevaron a cabo en columnas de vidrio empaquetadas con tierra de diatomeas silanizadas (80-100 Mesh) de diámetro interno comprendido entre 3.2-7.0 mm y una longitud de 1.2-1.6 m (171, 174). Las determinaciones más recientes de dichos herbicidas utilizan por lo general, columnas capilares (WCOT) de 0.2 mm de diámetro interno y longitudes comprendidas entre 20 y 25 m, con fases estacionarias enlazadas de polaridad media (181, 184-186), y de baja polaridad (175-180, 182, 183).

En cuanto a los sistemas de detección, tradicionalmente se han utilizado detectores de captura electrónica (ECD) debido a su alta rapidez de respuesta y su elevada sensibilidad, si bien en la actualidad, la espectrometría de masas se considera la técnica de detección más sensible y selectiva al proporcionar información estructural.

Sin embargo, muchas veces la determinación de estos herbicidas mediante GC es un procedimiento complicado puesto que su naturaleza polar hace que se adsorban a la fase estacionaria y se produzca asimetría de pico. Por otro lado, su baja estabilidad térmica y su baja volatilidad debido al enlace de hidrógeno del grupo carboxílico, hace que no se puedan determinar directamente y se deban llevar a cabo reacciones de derivatización a compuestos menos polares, más volátiles y térmicamente estables, que hagan posible su resolución y mejoren la separación cromatográfica (170, 187).

Tal y como se mencionó anteriormente, los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, se aplican en forma de ésteres y en un corto espacio de tiempo se hidrolizan a su forma ácida. Muchos métodos analíticos se basan en una hidrólisis básica de los ésteres para su posterior conversión a la forma metílica y análisis mediante GC, sin embargo este enfoque en ocasiones no resulta del todo adecuado ya que los herbicidas en condiciones fuertes de hidrólisis pueden destruirse formando múltiples compuestos de degradación que pueden interferir en el análisis (188).

Las reacciones convencionales de derivatización de herbicidas acídicos son la transesterificación, esterificación, sililación, alquilación o haloalquilación, alquilación extractiva pirolítica, pentafluorobencilación. Entre todos ellos la sililación es considerada quizás el procedimiento adecuado cuando el herbicida se encuentra a nivel de trazas ya que la sensibilidad de los silil-derivados es elevada (171, 175, 189).

La formación de ésteres metílicos parece ser el procedimiento más adecuado para el análisis de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, ya que proporciona tiempos de retención cortos y la preparación de muestra resulta sencilla. La gran ventaja que ofrece este procedimiento es la simplicidad en la preparación de la muestra. La reacción se lleva in situ en la propia muestra, siendo un proceso rápido y limpio, por otra parte, la eliminación del exceso de reactivos no es necesaria ya que los únicos subproductos son el sulfuro de metilo y metanol fácilmente eliminables (189).

Las reacciones de derivatización incrementan considerablemente el tiempo de análisis y el tratamiento de la muestra. Además, cuando se pretende distinguir y determinar simultáneamente herbicidas en forma ácida y de ésteres, la cromatografía de gases no resulta adecuada, por lo que en este caso, se debe recurrir necesariamente al empleo de técnicas de cromatografía de líquidos.

En bibliografía, se recogen numerosos ejemplos de determinaciones de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante GC. El diclofop-metil se ha determinado en suelos mediante GC-ECD alcanzando límites de detección menores de $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (171). En aguas de río y de lluvia, se ha conseguido determinar el diclofop-metil y el fenoxaprop-etil mediante GC-MS, con unos límites de detección menores a $0.11 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (176, 178).

El diclofop-metil, fenoxaprop-etil, fluazifop-butil, quizalofop-etil, mefenpyr-dietil y otros herbicidas ariloxifenoxipropiónicos se han determinado en diferentes alimentos

como hortalizas (177), cebada (179), miel (181), arroz (183) o frutas (185, 190) mediante GC-MS proporcionando límites de detección menores a $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En las determinaciones de aminoácidos mediante GC se utiliza por lo general, columnas capilares (WCOT) de 0.2 mm de diámetro interno y longitudes comprendidas entre 10 y 38 m, con fases estacionarias enlazadas de diferente polaridad (191-204).

En cuanto a los sistemas de detección tradicionalmente se han utilizado detectores de ionización en llama (FID), sin embargo la GC acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) es una alternativa útil a otros métodos de análisis de aminoácidos, especialmente cuando las cantidades de muestra son limitadas y se requiere alta sensibilidad.

La reacción de Husek es el procedimiento de derivatización más común en el análisis de aminoácidos por GC, el cual consiste en una rápida reacción en medio acuoso de los aminoácidos con etilcloroformato, piridina/etanol o trifluoroetanol (205). Recientemente la formación de ésteres se está imponiendo como otra posibilidad de derivatización ampliamente utilizada (195, 203).

La determinación de aminoácidos en alimentos como frutas, carne, miel, soja o ajos (191-193, 205-206) mediante GC-FID y en maíz y soja mediante GC-MS (202) permite alcanzar límites de detección en torno a los nmol.

5.1.1.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El análisis de residuos de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos en muestras medioambientales y alimentarias, se suele llevar a cabo con columnas de fase inversa C_{18} o C_8 de intercambio iónico, fases móviles acuosas y detección UV, fluorescente, con matriz de diodos o MS.

La demanda en los últimos 50 años de métodos más rápidos, poco costosos, que proporcionen una resolución adecuada y que consuman bajos volúmenes de disolvente ha hecho que en la actualidad los sistemas cromatográficos tiendan a la miniaturización. Por otra parte, la progresiva disminución en los tiempos de análisis ha dado lugar a un incremento en la caída de presión en la columna debido a la reducción tanto del tamaño de partícula, la longitud de la columna y el caudal utilizado en la

separación (207, 208). Gracias a los rápidos avances en instrumentación analítica y al gran desarrollo de columnas cromatográficas de tamaño de partícula reducido o de fases estacionarias nuevas, la tendencia actual de la cromatografía de líquidos es la utilización tanto de altas temperaturas, altas presiones o nuevos modos cromatográficos basados en el uso de nuevas columnas.

La **cromatografía de líquidos de alta temperatura (HTLC)** trabaja a temperaturas elevadas comprendidas entre $60 < T < 200$ °C. Este aumento de temperatura causa una significativa reducción de la caída de presión de la columna a caudal constante, siendo posible mantener la resolución y aumentar la velocidad de las separaciones (209).

En cromatografía de líquidos una disminución del tamaño de partícula del relleno de la columna supone una mejora de la eficacia, la velocidad óptima de separación y de la transferencia de masa, pero por otra parte una disminución en el tamaño de partícula provoca un aumento de presión en cabeza de columna. Teniendo en cuenta estas limitaciones de presión, recientemente se han comercializado bajo el término de **cromatografía líquida de ultra-alta presión (UPLC)** distintos equipos cromatográficos capaces de soportar altas presiones y trabajar con columnas de un tamaño de partícula inferior a 2 µm. En teoría, mediante UPLC es posible obtener análisis en tiempos menores a los que se obtendrían mediante HPLC convencional manteniendo la misma capacidad de separación (207, 210).

Con el fin de solucionar el problema del análisis de compuestos muy polares, recientemente se está implantando el uso de la **cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)**. En este modo cromatográfico el término “hidrofílico” se refiere a la afinidad de los analitos por el agua, y se caracteriza por el uso de una fase estacionaria polar similar a las que se usan en cromatografía en fase normal (NP) en combinación con una fase móvil parecida a las que se usan en fase inversa (RP), compuesta de más de un 50% de modificador orgánico (generalmente acetonitrilo) y agua o medio tamponado (sales amónicas, ácido fórmico o acético) logrando una retención y separación aceptables de analitos muy polares (211).

Tradicionalmente los empaquetamientos basados en sílice han sido los más utilizados en HPLC, puesto que su superficie se puede modificar con una gran variedad de fases y por tanto, permite introducir diferentes funcionalidades. En los últimos años, el desarrollo de nuevas fases estacionarias como las columnas

monolíticas o las **columnas de núcleo fundido** han mejorado la eficacia de las separaciones cromatográficas (212, 213).

La introducción **de micro-columnas** o **columnas capilares** en HPLC, término que se utiliza en general para referir columnas de pequeño diámetro, se debe a Horváth y col., quienes utilizaron en el año 1967 columnas empaquetadas de diámetro interno comprendido entre 0.5 y 1.0 mm (214), diámetro que en ciertos casos puede llegar a ser todavía menor, como en la cromatografía de líquidos conocida como nano-LC que utiliza columnas con un diámetro menor a 0.075 mm y caudales de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ o menores. Cuando la columna posee un diámetro comprendido entre 0.2-0.8 mm y el caudal entre $1\text{-}20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ se suele utilizar el término de **cromatografía capilar (cLC)**. Además de la disminución del consumo de disolventes, la disminución del diámetro de la columna de 4.6 mm a 300 μm provoca un incremento de sensibilidad del orden de 200 veces en detectores másicos lo que hace que se puedan inyectar cantidades mínimas de muestra, por tanto esta técnica es idónea para aquellos análisis en los que la cantidad de muestra disponible es restringida o los compuestos a determinar se encuentran presentes a bajas concentraciones cuando el detector utilizado sea de tipo másico (214-215). Por otra parte, y debido a la baja capacidad calorífica de la columna, resulta sencillo llevar a cabo gradientes de temperatura similares a la cromatografía de gases, que en muchos casos, mejoran notablemente la separación cromatográfica (216). Debido a la posibilidad de trabajar con pequeños volúmenes de muestra y a su reducida dilución cromatográfica, estas columnas poseen una excelente capacidad de acoplamiento con otras técnicas de detección como la espectroscopía de masas, Raman (217), resonancia magnética nuclear (218) o espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (219). El uso de micro-columnas aumenta la velocidad de la separación debido a la mayor velocidad lineal de la fase móvil, que junto con el pequeño caudal de la misma, permiten reducir la sobrepresión, conectar columnas en serie y conseguir eficacias de hasta $10^5\text{-}10^7$ platos teóricos, que permiten la resolución de mezclas complejas (208).

Sin embargo, la principal desventaja de la cromatografía capilar supone que puesto que el volumen de elución de los analitos se encuentra relacionado con el cuadrado del diámetro de la columna, el efecto de los parámetros que contribuyen al ensanchamiento de banda puede ser mayor con columnas de diámetro interno reducido y con volúmenes pequeños de inyección lo que implica necesariamente un control crítico de los procesos de ensanchamiento de banda para conseguir resoluciones y eficacias adecuadas (220). El volumen de muestra inyectado y el modo

en el cual el bolo de muestra se transfiere a la columna, afecta de forma considerable tanto al ensanchamiento de la banda cromatográfica como a la resolución entre picos. Para columnas con diámetros internos de entre 50 y 100 μm se suelen utilizar volúmenes de inyección de unos pocos nL y para columnas de 1.0 mm de diámetro interno un volumen de 1 μL . (220). En este caso, y si la inyección es manual, en cromatografía capilar se utilizan bucles internos de volumen fijo de hasta 20 nL (221), sin embargo estos bucles, además de ofrecer mucha resistencia, no son capaces de soportar presiones mayores de 280 bar, lo que resulta insuficiente muchas veces en cromatografía capilar (222).

Cuando el análisis requiere volúmenes menores, las técnicas de inyección se deben adaptar controlando tanto el tiempo de inyección como el caudal de fase móvil que circula a través del inyector, de tal manera que la inyección se puede realizar de diferentes modos, o bien por división, mediante llenado parcial o completo del sistema o mediante técnicas de enriquecimiento (223-224). Debido al pequeño volumen inyectado, en ocasiones se puede producir pérdida de sensibilidad en el proceso de detección, problema que por otra parte se puede minimizar inyectando grandes volúmenes de muestra y utilizando algunas de las denominadas técnicas de focalización. Estas técnicas tienen en común que el disolvente o la temperatura a la que se encuentra la muestra posee un poder de elución menor que el de la fase móvil o la temperatura utilizada para la separación, lo que permite que los analitos queden retenidos en un pequeño volumen cuando el bolo de muestra inyectado alcanza la cabeza de columna.

En el caso en que los analitos se encuentren en muy baja concentración pero en un volumen suficiente se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra, pero es necesario disminuir la posible pérdida de resolución causada por la sobrecarga de esos volúmenes. León-González y col han evaluado la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra (2-20 μL) con columnas de diámetro interno de 300 μm . En dicho estudio, la composición de la disolución de focalización se eligió cuidadosamente haciendo uso de métodos quimiométricos de optimización multivariante, ya que en algunos casos si los compuestos a analizar tienen propiedades ácido-base, se puede favorecer la disociación de dichas sustancias según la naturaleza de la disolución de focalización (225). En la bibliografía se recogen numerosos ejemplos del empleo de la utilización de grandes volúmenes de inyección empleando diferentes disoluciones de focalización. Rosales y col (108, 226) y Lumbreras y col (117) fijaron 20 μL como volumen de inyección añadiendo pequeñas

proporciones de modificador orgánico en la disolución de focalización altamente acuosa.

5.1.1.2.A) ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En los últimos años el acoplamiento LC-MS se ha impuesto como una herramienta fundamental de análisis; sin embargo, debido a la complejidad de ambas técnicas, la unión del cromatógrafo de líquidos y del espectrómetro de masas requiere el uso de una interfase que elimine la fase móvil antes de la introducción del analito en el MS. Dicha interfase no debe afectar o reducir en ningún caso la eficacia cromatográfica ni debe modificar la naturaleza química del analito. Por otra parte la transferencia de masa o la eficiencia de ionización en la interfase, debe ser lo suficientemente alta para permitir el análisis de todo tipo de analitos incluso en niveles de concentración de ultra trazas. Además las condiciones de operación de la interfase utilizada deben ser totalmente compatibles con las condiciones cromatográficas, incluyendo los caudales utilizados ($20 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ a $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), composición de la fase móvil y condiciones de alto vacío (214).

Habitualmente, el espectrómetro de masas se acopla al cromatógrafo de líquidos actuando como detector selectivo de masa (MSD) registrando una sola especie iónica para cada analito (a menudo el aducto molecular protonado $[M+H]^+$) o monitorizando más de un analito con diferentes relaciones m/z . Un diseño más complicado es el LC-MS/MS, conlleva el uso de un detector de monitorización de múltiples reacciones (MRM), mediante el cual se monitorízale ión molecular protonado, denominada en este caso el ión precursor (padre), y las fragmentaciones más comunes del mismo, conocidos como iones producto (hijos) (207).

▪ Modos de ionización en LC-MS: Interfases

Tal y como se ha señalado anteriormente, la interfase del sistema LC-MS es uno de los factores más importantes a tener en cuenta. La función de esta interfase es la de eliminar la fase móvil que proviene del cromatógrafo y a la vez generar los iones del analito en fase gaseosa para ser detectados por el espectrómetro de masas. La fase móvil pasa de líquido a gas con una expansión de volumen de aproximadamente 1000 veces, mientras que al mismo tiempo la presión se reduce desde presión

atmosférica (760 torr) a 10^{-5} - 10^{-6} torr en un espacio de flujo de 5-10 cm. Al reducir la presión la mayor parte de la muestra vaporizada y de la fase móvil va hacia el desecho (por lo que no existe concentración) y sólo una pequeña fracción de la misma entra en el MS.

Las interfaces más comunes en LC-MS son la ionización por electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI). Dado que parte del trabajo realizado en esta memoria se ha llevado a cabo utilizando el electrospray como modo ionización, éste se describirá con más detalle.

La **ionización por electrospray** es la interfase más utilizada en las aplicaciones bioanalíticas en los acoplamientos LC-MS, ya que es considerada la técnica de ionización más suave y por tanto poco probable de causar ningún tipo de degradación o fragmentación en los analitos.

El líquido que contiene el analito pasa a través de un capilar que se encuentra a presión atmosférica y al que se aplica un alto voltaje. Bajo la influencia del campo eléctrico creado, los iones de la misma polaridad migran hacia el extremo del capilar, donde el líquido comienza a formar un cono (**cono de Taylor**) a partir del que se generan pequeñas gotas altamente cargadas. Con el fin de permitir la formación de un spray estable, la nebulización es asistida por una corriente coaxial de nitrógeno (gas de nebulización). A medida que avanzan a lo largo de la fuente, las gotas se van haciendo cada vez más pequeñas debido a la evaporación del disolvente, de manera que el aerosol formado adquiere una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar las gotas del aerosol por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño (**límite de Rayleigh** $10^8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-3}$) que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial y escapar a la fase gaseosa (**explosión de Coulomb**), produciéndose así la evaporación iónica, es decir la formación de iones en estado gaseoso generalmente protonados (ión molecular +1, denominado ión cuasimolecular) y con una o más cargas. El proceso de ionización del analito en fase gaseosa se puede explicar a partir de dos teorías; la primera de ellas denominada **teoría de Dole o modelo de cargas residuales**, sostiene que la formación de los iones en fase gaseosa se produce por desorción de las moléculas de analito desde la superficie de la gota, mientras que el modelo propuesto por **Iribarne Thomson (modelo de evaporación de iones)** establece que dicho proceso es debido a la emisión directa de los iones de analito

preformados en la gota. Tras su paso por el analizador, el registro medirá la relación masa/carga (m/z) de estos iones (figura 9). Teniendo en cuenta que el electrospray es un método de ionización débil, se obtendrán especies moleculares no fragmentadas y en raras ocasiones un análisis proporcionará información estructural. (207, 227).

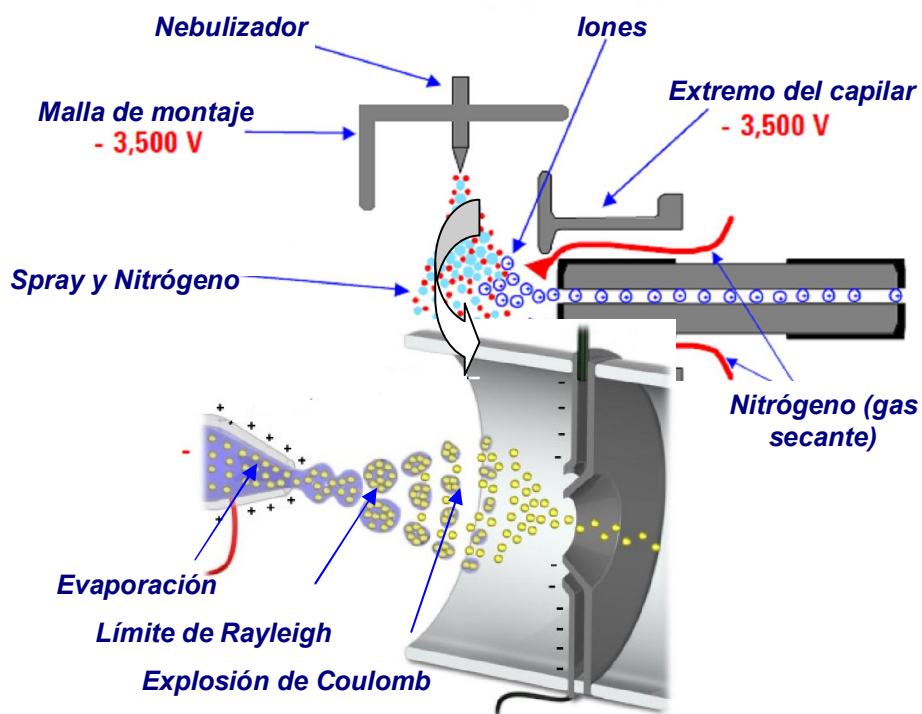


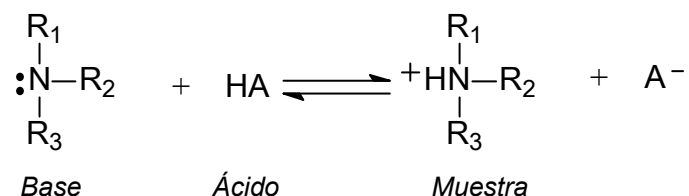
Figura 9. Interfase ESI-MS

Este tipo de interfase se caracteriza por su facilidad de manejo y mantenimiento y su buena sensibilidad, siendo adecuado para una amplia variedad de analitos tanto de polaridad moderada como elevada.

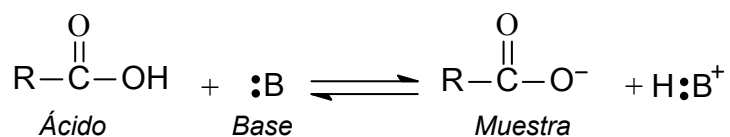
Sin embargo y dado que los iones se generan mediante nebulización en la propia fase móvil, es necesario tener en cuenta algunas limitaciones relacionadas con la composición y naturaleza de la misma. Como regla general, para el trabajo con ESI se utilizan medios tamponados de baja fuerza iónica ya que son los que proporcionan una mejor sensibilidad de la señal. El empleo de tampones que contengan elementos no volátiles produce una contaminación de la fuente de ionización del MS, perjudicando la sensibilidad de la señal. Por otra parte, no todos los compuestos pueden formar fácilmente el ión molecular $[M+1]$. La cantidad y tipo de iones en

disolución dependerá del pH de la fase móvil, así el pH básico (>7) favorecerá la formación de iones negativos, y el pH ácido (<7) la de iones positivos, por lo que, dependiendo de las condiciones, se puede trabajar en dos modos (228):

- Modo de iones positivo:



- Modo de iones negativo:



Los medios ácidos como el ácido fórmico (0.1-1.0%), ácido acético (0.1-1.0%), ácido trifluoroacético (TFA, 0.05-2.0%), acetato amónico, formiato amónico favorecerán la formación de iones positivos, sin embargo, en medios básicos como el hidróxido amónico (pH 10-11) predominará la formación de iones negativos.

En términos generales, los compuestos que pueden ser estudiados mediante ESI son compuestos intrínsecamente cargados en disolución, compuestos neutros/polares que pueden ser protonados o desprotonados dependiendo del pH de la fase móvil, o compuestos no polares que bajo oxidación/reducción alcanzan el capilar del electrospray. La desolvatación de las gotas formadas, y por tanto la ionización de los analitos, se favorece por la producción inicial de pequeñas gotículas. Por esta razón, se debe evitar el uso de fases móviles con gran tensión superficial o alta viscosidad, siendo el metanol, acetonitrilo, isopropanol, acetona, o tetrahidrofurano (THF), los disolventes más utilizados. La cromatografía con fases estacionarias HILIC ofrece otras ventajas claras en el acoplamiento con espectrometría de masas, ya que al aumentar la proporción de modificador orgánico en la fase móvil, la viscosidad de esta se reduce enormemente, lo que se traduce en una disminución en la presión y un aumento en la eficacia de separación, por lo que resulta ideal para acoplar a la espectrometría de masas, ya que el uso de una gran cantidad de modificador orgánico

mejora la eficacia de desolvatación cuando se utiliza electrospray como fuente de ionización (211). La concentración del tampón de la fase móvil afecta directamente al tamaño de las gotas generadas, cuanto mayor es la concentración de este, menor es el tamaño de las mismas. Además dicho parámetro afecta a la eficacia de ionización, a altas concentraciones ($>10^{-3}$ M) la relación entre la respuesta del detector y la concentración del analito deja de ser lineal (227, 229).

El caudal de fase móvil que proviene del cromatógrafo afecta tanto al tamaño de las gotas como a la distribución de tamaños de las mismas y por tanto en el número de cargas presentes. El electrospray alcanza su máxima eficacia a caudales comprendidos entre $5-10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, incompatibles para la práctica mayoría de las columnas cromatográficas convencionales de 4.6 mm de diámetro interno. En estas condiciones la eficacia de ionización alcanza el 100% aunque en definitiva el electrospray se comporte como un detector dependiente de la masa, es decir, que la intensidad de señal depende de la cantidad de analito que alcance la aguja del mismo. El uso de microcaudales menores de $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ permite la utilización de fases móviles altamente acuosas ya que se minimizan los problemas de la alta tensión superficial y conductividad. Las interfases tipo ESI o interfases específicas para cromatografía capilar como por ejemplo el bombardeo de átomos rápidos (FAB), funcionan mejor si la mayor parte del disolvente es eliminado antes de la ionización además de tolerar solamente caudales de fase móvil menores en torno al $\mu\text{L min}^{-1}$. Con las técnicas de micro-HPLC, el uso de nebulizadores de microflujo permite que el soluto, que se distribuye a través de un gran número de partículas de baja masa, se vaporice rápidamente en la fuente de iones, minimizándose su descomposición térmica (207, 227-228).

El proceso de formación de las gotas en el electrospray es susceptible de sufrir efectos de competición/supresión derivados de la presencia de especies iónicas polares presentes en disolución (aditivos, tampones, etc.). Algunos autores sugieren que si estas especies se encuentran en una concentración superior a 10^{-5} M, pueden competir con el analito por el acceso a la superficie de las gotas en fase gaseosa. Otra hipótesis es que si la muestra contiene componentes no volátiles, las gotas no llegan a alcanzar su radio crítico y por lo tanto la superficie de las gotas formadas se reduce substancialmente. Como resultado de estos efectos, la respuesta de un analito en disolvente puro puede diferir significativamente de cuando se encuentra en muestra (230).

▪ **Analizadores en LC-MS**

Los analizadores de masas deben proporcionar una identificación y cuantificación de los analitos con un elevado grado de sensibilidad y selectividad. A pesar de que el sistema LC-ESI puede, en principio, acoplarse a cualquier tipo de analizador (trampa de iones, cuadrupolo, sector magnético y tiempo de vuelo), los más empleados hasta ahora son el cuadrupolo y la trampa de iones ya que tienen un coste relativamente asequible y ofrecen menos dificultades técnicas que otros tipos de analizadores (227).

Dado que parte del trabajo realizado en esta memoria se ha llevado a cabo utilizando cLC-MS con analizador de **cuadrupolo**, será éste el analizador que se describirá brevemente a continuación.

Tal y como sugiere su nombre, los analizadores de masas cuadrupolares se componen de cuatro varillas paralelas equidistantes a un eje central imaginario, como se muestra en la figura 10. La sección transversal contiene las cuatro superficies conductoras o polos que adoptan idealmente la forma de 2 hipérbolas ortogonales. A las varillas opuestas, que corresponden a cada una de las hipérbolas, se le aplica un potencial de corriente continua U (500-2000 V) de igual signo y opuesto al de las otras dos varillas. Adicionalmente se aplica un potencial de radiofrecuencia V (0- 3000 V) asociado con una radiofrecuencia de tal forma que los iones avanzarán a lo largo del analizador siguiendo trayectorias oscilantes siendo repelidos y atraídos continuamente por las placas polares.

Para valores definidos de U y V únicamente los iones con determinada relación m/z atravesarán el analizador y alcanzarán el detector, mientras que el resto se desestabilizan y chocarán contra las barras. Manteniendo constante la relación entre la amplitud de los campos de corriente continua y radiofrecuencia (U/V constante) y variando su intensidad, se logra que los iones de diferente m/z salgan del analizador de manera sucesiva generándose así el espectro de masas.

El tiempo empleado por los iones en atravesar el analizador debe ser corto comparado con el tiempo necesario para cambiar de un valor m/z a otro, pero lo suficientemente largo como para que ocurran varias oscilaciones.

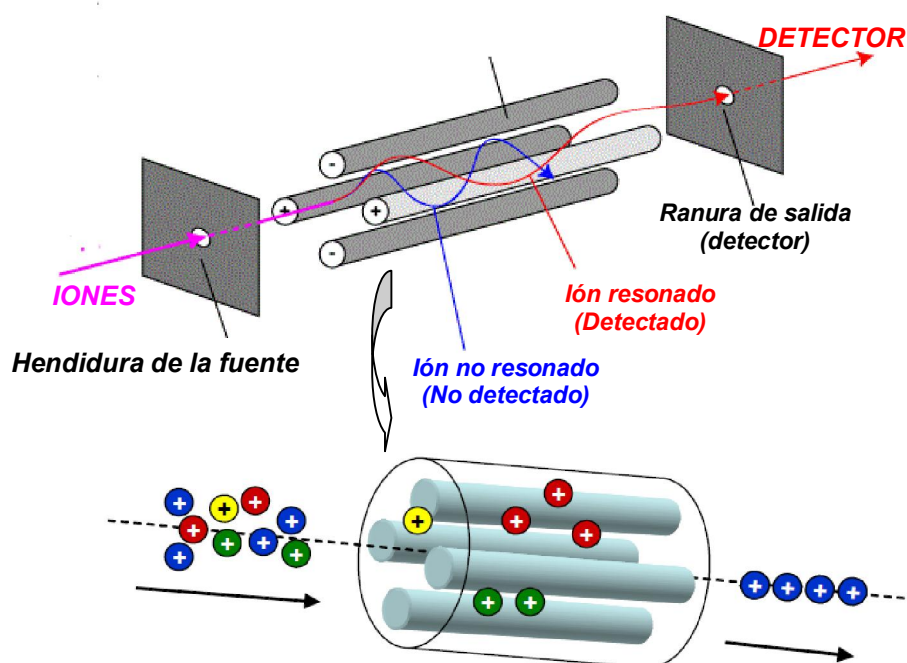


Figura 10. Esquema de un cuadrupolo sencillo.

El margen de masas, relación m/z detectable, se limita a unos 4000 Th (**unidades Thompson**). Dado que la velocidad de barrido de un cuadrupolo puede ser de 1000 Th/s e incluso mayor, el barrido de un espectro completo (SCAN) resulta muy rápido lo que hace que sea muy apropiado para su acoplamiento con sistemas cromatográficos. Estos analizadores son además robustos, muy compactos, de bajo costo comparados con otros tipos de analizadores y de fácil utilización. Por otra parte, se trata de instrumentos de baja resolución (~ 3000), lo cual implica que usualmente operen en resolución unitaria, es decir que trabajan con resolución suficiente para separar dos picos distantes una unidad de masas (227).

El analizador de cuadrupolo permite llevar a cabo experimentos MS-MS, mediante la unión en serie de tres cuadrupolos, utilizando el primer cuadrupolo para escanear un rango de m/z preseleccionado y aislar un ión en particular. El segundo cuadrupolo, también conocido como celda de colisión, enfoca y transmite los iones mientras se aplica un gas (argón o helio) para provocar la fragmentación por colisión inducida del ión precursor seleccionado y el tercer cuadrupolo sirve para analizar los fragmentos generados en la celda de colisión y eliminar los fragmentos neutros que se han generado. Estos analizadores (QqQ-MS) se han aplicado fundamentalmente al análisis cuantitativo debido a la gran selectividad y sensibilidad que proporcionan.

cuando operan en modo SRM (selected reaction monitoring), aunque también pueden ser útiles con fines identificativos y de elucidación estructural (207, 227).

5.1.1.2.B) DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS MEDIANTE HPLC NO QUIRAL

La cromatografía de líquidos es una alternativa útil y sensible a los métodos basados en cromatografía de gases para el análisis de herbicidas tipo ariloxifenoxipropiónicos, con la ventaja de no requerir la esterificación de los herbicidas ácidos para su determinación permitiendo y por otro lado distinguir entre los herbicidas en forma ácida y de éster.

La separación de estos compuestos se ha llevado a cabo principalmente mediante cromatografía de líquidos de fase inversa con columnas C₁₈ de distintas dimensiones. Actualmente y debido a las ventajas que ofrece el uso de columnas con un tamaño de partícula menor a 2 µm, la bibliografía recoge numerosos ejemplos de aplicaciones de UPLC en la separación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices. Por otra parte siguiendo la tendencia de la miniaturización de los sistemas cromatográficos, Asensio-Ramos y col (244) han determinado con éxito haloxyfop y diclofop en muestras de aguas mediante nano-cromatografía.

Los detectores más utilizados para su determinación han sido UV, DAD y MS, ya que los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos presentan dos bandas de absorción; la primera, y más intensa en el intervalo de 230-235 nm y la segunda alrededor de 280 nm. La detección UV con longitud de onda fija o variable se utiliza frecuentemente en el análisis de residuos de estos herbicidas debido a su amplio intervalo de aplicación, sencillez, estabilidad y bajo coste en comparación con otras técnicas de detección, si bien no resuelve el problema de la identificación y/o confirmación de compuestos de la misma familia química por la elevada similitud entre espectros.

La detección con matriz de diodos acoplada a la espectrometría de masas ha permitido incrementar la capacidad de confirmación y combinada con técnicas de extracción en fase sólida (SPE), utilizando cartuchos con distintos tipos de relleno, se ha utilizado para la determinación de residuos de ariloxifenoxipropiónicos, con límites de detección del orden de µg·g⁻¹ y ng·g⁻¹ en distintos tipos de matrices, principalmente agua y lodos. Aunque la detección UV ha sido la técnica de detección habitual, la

espectroscopía de masas se está imponiendo últimamente debido a su sensibilidad, selectividad y capacidad de confirmación gracias a los acoplamientos MS/MS, lo que permite llevar a cabo determinaciones de pesticidas a los niveles establecidos según las normativas vigentes. Además, en comparación con la detección UV, las desviaciones de la línea base producidas por las sustancias endógenas de la propia muestra son menores cuando se utiliza el detector de MS e inexistentes cuando se utiliza MS-MS, debido a su mayor selectividad.

En el análisis de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, las interfases más utilizadas han sido ESI, API, caracterizadas por ser técnicas blandas de ionización que proporcionan predominantemente, tal y como se reseñó anteriormente, iones moleculares protonados $[M+H]^+$ o desprotonados $[M-H]^-$ (248). En bibliografía se recogen algunos ejemplos que han utilizado como interfases el ionspray (ISI), o el electrospray asistido por turbonebulización (TISP), caracterizadas por ser fuentes de ionización más suaves. Sin embargo, ya que el rendimiento de fragmentación es bajo, la confirmación e identificación de las moléculas es dificultosa. Por ello, en algunos casos se ha utilizado la formación de aductos de iones con disolventes como formiato amónico, acetonitrilo y otros no polares, para obtener información estructural complementaria al espectro TISP y así facilitar la identificación. Recientemente, el uso del analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) acoplado con la cromatografía de líquidos se ha impuesto como herramienta para el análisis de residuos de multitud de pesticidas entre los que se encuentran algunos herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en frutas y multitud de variedades de vegetales, proporcionando límites de detección del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (240).

Con respecto a la extracción de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, tradicionalmente se han empleado diferentes cartuchos de extracción en fase sólida. La tendencia actual es la simplificación de dichos procedimientos utilizando el denominado **método QuEChERS** (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe). Dicho método está ganando popularidad como método de análisis de multi-resíduos de pesticidas en alimentos y productos agrarios. Básicamente el método QuEChERS es un proceso de dos etapas: extracción y clean-up:

- La etapa de extracción usa MgSO_4 para reducir el contenido de agua en la muestra y NaCl para la mayoría de las aplicaciones o acetato de sodio anhidro para compuestos sensibles a pH alcalinos. Los productos para la etapa de extracción se suministran en tubos de polipropileno para centrifuga de 50 mL para facilitar la extracción.

- La etapa de clean-up usa PSA (amina primaria/secundaria) para la eliminación de ácidos orgánicos y pigmentos polares además de otros productos. Algunos productos, además de PSA, tienen C18 para la eliminación de la mayor parte de los lípidos y esteroides, o carbón grafitizado para la eliminación de esteroides y pigmentos como la clorofila.

El método QuEChERS para la extracción de pesticidas en alimentos, ha sido aprobado por la AOAC (Método 2007.01) y en Europa bajo prEN-15662. Por otro lado, el método QuEChERS ha resultado ser selectivo y eficaz para la extracción de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en determinaciones multiresiduo en matrices complejas como zumos de fruta, cereales o té.

En la tabla 10 se muestran en detalle algunos de los métodos publicados para la determinación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía de líquidos.

Tabla 10. Determinación no quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Herbicida	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
clodinafop, fluazifop, haloxyfop, diclofop, fenozaprop, quizalofop	C ₁₈ Supelco 25 cm x 4.6 mm	Acetonitrilo/metanol (70:30) Agua acidificada (gradiente)	DAD	7-20 ng·L ⁻¹	90-98%	Hidrólisis de los ésteres para generar los compuestos ácidos	Distintos tipos de aguas	231
fluazifop-butil, fenoxaprop-etil, quizalofop-etil, haloxyfop-etil, diclofop-metil y sus ácidos,	C ₁₈ Alltima 25 cm x 4.6 mm	Acetonitrilo/metanol(70:30) (gradiente)	ESI-MS Modo SIM	3-30 ng·L ⁻¹	92-97%	Limpieza mediante 0.5 g de GCB	Distintos tipos de aguas	232
fenoxaprop-P y otros herbicidas	C ₁₈ Kromasil 150mm×4.6 mm	Polioxietileno/lauril eter en solución acuosa de tampón fosfato	UV (224 nm)	-	-	Cromatografía micelar. Determinación de 85 pesticidas de 6 familias diferentes	Peces	233
haloxyfop-metil, haloxyfop-2-etoxietil, quizalofop-etil, fluazifop-P-butil	C ₁₈ Atlantis 2.1mm×100 mm	Metanol/agua/ácido fórmico 0.01%	ESI-MS/MS Modo MRM	< 0.01 mg·kg ⁻¹	70-110%	Pesticidas de mas de 10 familias diferentes	Limón, pasas, tomate	234
fluazifop-butil, clodinafop-propargil	C ₁₈ Atlantis 2.1mm×150 mm	Acetonitrilo/agua (gradiente)	API-MS/MS Modo SIM	< 150 µg·kg ⁻¹	55-125%	Determinación de mas de 660 pesticidas	Peces	187
Haloxyfop-etil, fenoxaprop-etil, fluazifop-butil, quizalofop-etil, diclofop-metil y sus ácidos	C ₁₈ Alltima 25 cm x 4.6 mm	Acetonitrilo/agua (gradiente)	ISI-MS Modo SIM	< 10 ng·L ⁻¹	> 83 %	Limpieza mediante 0.5 g de GCB	Distintos tipos de aguas	235

Tabla 10 (Continuación). Determinación no quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Herbicida	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
fluazifop butil, y otros pesticidas de varias familias	Columna Acquity UPLC BEH C ₁₈ 100mm×2.1mm	Metanol/ácido fórmico 0.01% (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	< 5 µg·L ⁻¹	70-108%	Extracción de más de 90 pesticidas mediante el método QuEChERS	Zumo de frutas	236
diclofop-metil, mefenpyr-dietil, fenoxaprop-etil,	Columna Waters Symmetry C ₁₈ 150mm×3 mm	Metanol/agua (gradiente)	ESI-MS/MS Modo SRM	< 23 µg·kg ⁻¹	72-113 %	Comparación de los métodos tradicionales de SPE con el método QuEChERS	Cebada	237
cyhalofop-butil y otros herbicidas	Columna ULTRA C ₁₈ 4.6 x 150 mm)	Acetonitrilo/agua acidificada % ácido fosfórico (gradiente)	DAD	< 0.04 µg·L ⁻¹	70-122 %	Comparación de cartuchos de extracción de distinto relleno	Agua potable y de arrozales	238
clodinafop-propargyl, fluazifop-butil, haloxyfop, qu+izalofof, quizalofof-etil,	C ₁₈ Atlantis 2.1mm×100 mm	Acetonitrilo/acetato amónico (gradiente)	ESI-MS/MS	< 5 µg·kg ⁻¹	81-110 %	Comparación método QuEChERS con el método oficial 2007.01	Frutas y comidas vegetales infantiles	239
fenoxaprop-etil, haloxyfop, haloxyfop-etotil, haloxyfop-metil, quizalofof-etil y mas de 250 pesticidas	Columna XDB-C ₁₈ UPLC 4.6 mm × 50 mm	Acetonitrilo/agua acidificada 0.1% ácido fórmico (gradiente)	TOF-MS Modo MRM	< 50 µg·kg ⁻¹	~100%	Extracción de pesticidas mediante el método QuEChERS	60 tipos de frutas y vegetales	240

Tabla10 (Continuación). Determinación no quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Herbicida	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Fenoxaprop-P-etil	Columna Nov-pak 4mm C ₁₈ 150×4.6 mm	metanol/agua (85:15, v/v)	DAD	-	-	Estudio de la degradación producida por bacterias del lodo	lodos	241
fluazifop, diclofop y herbicidas de 5 familias	Columna C ₁₈ Alltima 25 cm x 4.6 mm	Acetonitrilo/agua acidificada con ácido fórmico (22:78, v/v)	TISP-MS/MS Modo MRM	0.13-1.36 ng·g ⁻¹	76-90 %	Extracción de los pesticidas mediante SCE	Suelos	242
fenoxaprop-etil, diclofop-metil, fluazifop-butil y otros herbicidas clorados	Columna Luna C ₁₈ y Luna CN 250mm×4.6mm	Acetonitrilo/agua acidificada con ácido fosfórico pH 3.5 (gradiente)	DAD	0.012-0.035 µg·L ⁻¹	76-100%	Comparación de la extracción con cartuchos de distinto relleno	Aguas	243
haloxyfop, diclofop y otros 10 herbicidas	Nano columna empaquetada con Pinnacle™ II Phenyl	Acetonitrilo/agua acidificada con 0.1% ácido fórmico (gradiente)	UV (200 nm)	0.016-0.067 µg·L ⁻¹	22-91 %	Extracción de los analitos mediante nanotubos de carbono (MWCNTs)	Aguas	244
diclofop-metil, fluazifop-P-butil, haloxyfop-etotil, haloxyfop-P, haloxyfop-P-metil, mefenpyr-dietil, propaquizafop, y otros 200 herbicidas	Columna Acquity UPLC HSS T3 100mm×2.1mm	Metanol/formiato amónico 0.005 M (gradiente)	TOF-MS Modo MRM	< 10 µg·kg ⁻¹	-	Extracción de pesticidas mediante el método QuEChERS	Frutas y vegetales	245

Tabla 10 (Continuación). Determinación no quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Herbicida	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
fluazifop-butil y otros herbicidas	Columna Acquity UPLC BEH C ₁₈ 100mm×2.1mm	Metanol /agua acidificada 0.01% ácido fórmico(gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	0.01-5.61 µg·L ⁻¹	-	Extracción mediante HF-LPME sin clean up	Bebidas alcohólicas	246
fluazifop-P-butil y otros herbicidas	Columna Acquity UPLC BEH C ₁₈ 100mm×2.1mm	Acetonitrilo /agua acidificada 0.02% ácido fórmico(gradiente)	API-MS/MS Modo MRM	< 0.01 mg kg ⁻¹	70-120 %	Extracción mediante el método QuEChERS	Té	247
fluazifop-butil y 50 pesticidas más	Columna Synergi Hydro-RP 80 A, 150mm×2.0mm	Metanol/acetato amónico (gradiente)	API-MS/MS Modo MRM	<10 ng·g ⁻¹	70-120%	Extracción de los pesticidas con cartuchos de modo mixto	tabaco	248
quizalofop y 11 pesticidas más	Columna C ₁₈ Zorbax Eclipse 50mm×2.1mm	Acetonitrilo/ácido acético 0.01% (modo gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	< 57 ng·g ⁻¹	40-115%	Método validado y aplicado al análisis de rutina	Agua, sedimentos y peces	249
Fluazifop. Haloxyfop y diclofop	Columna C ₁₈ Supelco 25 cm x 4.6 mm	Atonitrilo/agua acidificada con ácido fórmico (80:20, v/v)	ESI-MS Modo SIM	~ 1 ng·g ⁻¹	89-90%	Extracción mediante SCE y limpieza mediante carbono grafitado	Suelos	250
Fluazifop-P-butil y otros biopesticidas y mocotoxinas	Columna Acquity UPLC BEH C ₁₈ 100mm×2.1mm	Metanol/formiato amónico 5 mM (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	< 10 µg·kg ⁻¹	70-120 %	Extracción mediante el método QuEChERS	Cereales, vegetales y vinos	251

5.1.1.2.C) DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS MEDIANTE HPLC NO QUIRAL

La separación de aminoácidos se ha llevado a cabo principalmente mediante cromatografía de intercambio iónico con posterior derivatización post-columna con ninhidrina y detección UV a una o dos longitudes de onda, o derivatizados con o-ftaldialdehído (OPA) si la detección es mediante fluorescencia. Dichas fases estacionarias, proporcionan gran eficacia, y un excelente poder de resolución. Sin embargo el tiempo de análisis es elevado, proporcionando a veces picos demasiado anchos. Por otro lado, la postderivatización dificulta la estabilidad y mantenimiento del sistema.

En la actualidad la mayoría de separaciones cromatográficas de aminoácidos se llevan a cabo mediante cromatografía en fase inversa utilizando columnas C_8 o C_{18} , con tamaños de partícula comprendidos entre 1.7 - 5 μm , y diámetros de 3 - 4.6 cm. Las fases móviles se basan en mezclas de agua o un medio tamponado y disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo y THF). Como los aminoácidos muestran polaridades muy variadas, el análisis cromatográfico requiere de elución en gradiente.

Por otra parte y al igual que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, la miniaturización de los sistemas cromatográficos se está imponiendo como técnica habitual de análisis de aminoácidos. Se ha llevado a cabo la separación cromatográfica de aminoácidos y aminos neuroactivos mediante el uso de una nano columna de 75 μm de diámetro interno empaquetada en el propio laboratorio o mediante columnas capilares comerciales llegando a límites de detección comprendidos entre los nmol y pmol (252-253). Otra posibilidad, es el uso de columnas semi capilares, las cuales resultan más económicas que las capilares, no requieren un sistema adaptado para el trabajo con microcaudales y proporcionan resultados bastante satisfactorios. En bibliografía, también se recogen numerosos ejemplos que emplean columnas monolíticas y columnas de tecnología de núcleo fundido para el análisis de aminoácidos en muestras biológicas y productos fermentados respectivamente. Debido a las ventajas que ofrece el uso de columnas con un tamaño de partícula menor a 2 μm la separación de aminoácidos en miel también se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida UPLC llegando a límites de detección de $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (262).

El uso de la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) con fases estacionarias **modificadas con grupos zwitteriónicos (ZIC®-HILIC)** y fases móviles

con alto contenido en acetonitrilo (~ 90%) se ha convertido en la solución al problema de la separación de los aminoácidos más polares mediante cromatografía en fase inversa, proporcionando una retención y separación aceptable de los aminoácidos en diversas matrices complejas, como colágeno o medios de fermentación, con límites de detección en torno a los pmol (254-256).

En cuanto a la detección, los aminoácidos aromáticos pueden ser detectados directamente sin ningún proceso de derivatización mediante UV utilizando longitudes de onda comprendidas entre 210-260 nm. Sin embargo, este tipo de detección directa queda únicamente restringida a este tipo de aminoácidos, por lo que si se quieren detectar el resto de aminoácidos mediante UV o DAD es necesario un proceso de derivatización. Debido a su mayor sensibilidad, la fluorescencia sigue siendo la técnica más común de detección, aunque requiere un proceso pre- o post-columna de derivatización. Los agentes derivatizantes más utilizados en el análisis de aminoácidos son la ninhidrina, el cloruro de dansilo, o-ftaldialdehído (OPA), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), fenil isotiocianato (PITC), algunos reactivos fluorados de composición registrada o 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F).

Aunque es posible el uso de otras técnicas de detección sin derivatización como es el caso de la detección electroquímica o de conductividad, al igual que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos la espectroscopía de masas se está imponiendo últimamente como técnica de detección debido a su sensibilidad, selectividad y capacidad de confirmación en acoplamientos MS/MS. En el análisis de aminoácidos, en general las interfases más utilizadas han sido ESI ó API, fuentes de ionización suaves que generan una mínima fragmentación proporcionando espectros sencillos y de elevada sensibilidad cuando se utiliza en modo SIM.

Es sin duda en el análisis de metabolitos de aminoácidos dónde las concentraciones esperadas suelen ser bastante bajas, cuando la espectrometría de MS resulta ser la técnica de detección más eficaz. Por ejemplo, en el caso del análisis de serotonina y sus precursores, triptófano y 5-hidroxitriptófano, aunque la detección por fluorescencia ha proporcionado excelentes resultados en matrices complejas como el café tostado, la espectrometría de MS ha llegado a límites de detección comprendidos nmol-pmol en matrices tan complejas como fluidos, suero o frutas.(61, 269, 274-275, 277-278).

En cuanto al tratamiento de muestra, en la mayoría de los casos se han utilizados hidrólisis ácidas o básicas. La hidrólisis ácida implica la utilización de HCl 6 M ó 6 N durante un periodo de tiempo de más de 10 horas y a una temperatura superior a 100 °C, o HCl diluido en condiciones más suaves. Este tipo de hidrólisis, aunque resulta eficaz, puede producir la degradación o destrucción de los aminoácidos más lábiles como es el caso del triptófano. Ante esto, muchos autores han preferido la utilización de hidrólisis básicas, que se basan en la utilización de NaOH en concentración comprendida entre 2-4 N y a temperaturas moderadas (~ 40 °C). Este procedimiento aunque resulta menos agresivo que las hidrólisis ácidas, también puede provocar la degradación de los aminoácidos o racemizaciones moderadas de los mismos. Ante estos problemas, hoy en día, muchos análisis requieren de extracciones controladas asistidas con ultrasonidos bien en medio ácido débil como HCl diluido ó ácido perclórico, ácido acético o TCA medio acuoso, medio antioxidante, medio tamponado o medio metabólico. Dichos procedimientos, además de requerir un menor tiempo de tratamiento de la muestra, evitan tanto la degradación como racemización de los aminoácidos más lábiles, proporcionando eficacias similares a los medios tradicionales de hidrólisis.

En la tabla 11 se muestra en detalle algunos de los métodos publicados para la determinación de aminoácidos mediante cromatografía de líquidos.

Tabla 11. Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Hys, Trp, Phe,	Nano Columnas monolíticas basadas en DMAA y MAA de 75 µm i.d.	Acetonitrilo/metanol (40:60,v/v) (gradiente)	UV (214 nm)	-	-	Comparación de la electrocromatografía capilar con la nano-cromatografía	-	252
Hys, Met, Leu, Phe, Trp, Tyr	Columna capilar micro 21 C ₁₈ S 150 x 0.5 mm	Acetonitrilo/tampón fosfato 30 mM pH 4.5 (gradiente)	TL-UV (210 nm)	0.3-5 pmol	-	Sistema de detección que amplifica la absorción en UV	-	253
20 aminoácidos proteicos y otros metabolitos de procesos de fermentación	Columna ZIC®-HILIC 50×4.6 mm;	Acetonitrilo/ácido fórmico 200 mM pH 5 (90:10,v/v) (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	-	-	Comparación de la columna Luna HILIC con ZIL-HILIC	Medios de fermentación	254
Ala, Leu, Pro, Val y Phe	Columna ZIC®-HILIC 50×4.6 mm	Acetonitrilo/acetato amónico 10 mM (90:10,v/v) (gradiente)	ESI-MS Modo SIM	0.003 - 0.04 pmol·µL ⁻¹		Hidrólisis en HCl 6 M a 130 °C 48 horas	Angiotensina humana, y BSA	255
Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val, Asn, Gln	Columna ZIC®-HILIC 50×4.6 mm	Acetonitrilo/acetate amónico 5 mM (90:10,v/v) (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	0.1-59 µg·g ⁻¹	79-107%	Hidrólisis en HCl (25%) a 100 °C 5 horas	Pintura mural artística	256
Aminoácidos aromáticos :Tyr, Phe, Trp	Columna C ₁₈ Megres 4.6 ×250mm	Acetonitrilo/agua (10:90, v/v)	FLD -	0.0004-0.5 µmol	94-104 %	Inyección directa de las muestras previa desproteización con ácido perclórico.	Plasma de pacientes con problemas hepáticos	257

Tabla 11 (Continuación). Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Aminoácidos alifáticos, Phe, Tyr, Met y α -ceto ácidos	Columna LiChroCart 125-4 Purospher RP-18e 4.6 ×250mm	Metanol/hidrogenofosfato de sodio 25 mM pH 6.5 (10:90, v/v)	FLD Derivatización con OPA	~22 μ mol	91-94 %	Hidólisis suave con HCl 0.001 M	Sangre	258
Asp, Glu, Ser, Gly, His, Thr, Ala, Arg, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu, Phe and Lys	Columna C ₁₈ PICO-TAG 150 x 3.9 mm	Acetonitrilo/acetato sódico 0.14 M con TEA 0.15 mM	FLD Derivatización con PITC.	-	-	Hidrólisis en HCl 6 N a 110 °C, 24 horas	Formulaciones infantiles	129
Asp, Ser, Glu, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu, Phe	Columna C ₁₈ Nova-Pak 30 cm × 3.9 mm	AccQ – Tag/acetonitrilo/agua (gradiente)	FLD Derivatización con el reactivo fluorado AccQ	-	-	Derivatización y análisis mediante reactivos registrados	Cervezas	259
Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, His, Met, Phe, Ser, Thea, Thr, Trp, Tyr	Columna C ₁₈ Zorbax Eclipse XDB 4.6 ×150mm	Metanol/acetonitrilo/ Agua/tampón fosfato (gradiente)	DAD Derivatización con OPA	11.8-94.7 ng,	89.- 107.4%.	Limpieza de los extractos mediante cartuchos Sep-Pak-C18	Te y flor de te	260
Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, His, Gly, Thr, Arg, Ala Tyr, Met, Trp, Val, Phe, Ile, Leu, Lys	Columna C ₁₈ Nova-Pak 30 cm × 3.9 mm	Metanol/tampón fosfato THF (gradiente)	FLD Derivatización con OPA en un bucle de inyección de muestra	0.71-8.26 mg·L ⁻¹	63-98 %	Tratamiento de muestra mediante dilución en tampón borato 0.4 M o agua	Miel y vinos	261

Tabla 11 (Continuación). Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
His, Ser, Arg, Gly, Asp, Glu, Thr, Ala, Hylys, Pro, Cys, Lys, Tyr, Met, Val, Ile, Leu, Phe, Tau, GABA, Orn, Gln, Asn, Trp	Columna Ultra Acquity UPLC AccQ-Tag 2.1 x 100 mm	AccQ –Tag Ultra (5%)/ AccQ –Tag Ultra (gradiente)	UV (260 nm) Derivatización con el reactivo AccQ-Tag Ultra	12.9-69.3 ng·mL ⁻¹	90.1-100.9%	Derivatización y análisis mediante reactivos registrados	Jalea real	262
Ala, Arg, Asp, Cys–Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val	Columna XTerraR MS C ₁₈ 150 x 2.1mm	Acetonitrilo/formiato amónico 15 mM/agua (gradiente)	ESI-MS Modo SIM Derivatización pre-columna con AQC	0.07–0.24 µg·g ⁻¹	82.8 - 111.0 %	Hidrólisis en HCl 6 M a 105 °C, 12 horas	Suelos	263
o-Tyr, m-Tyr	Columna Inertsil ODS-2 250 x 2.1 mm	TCA 0.05 M/ácido acético/ Metanol (96:1:3; v:v:v)	Detección dual coulométrica y amperométrica	1.2-1.9 µg·L ⁻¹	-	Estudio sobre la variación de los isómeros de la Tyr en alimentos irradiados	Huevo líquido y clara de huevo	126
Isómeros 4,5,6,7- hidroxí triptófano	Columna C ₁₈ Nucleosil 120-3 RP 250 x 4 mm	TFA (0.1%)/metanol/ Acetonitrilo (gradiente)	UV-FLD (260 nm)	7-250 µg·L ⁻¹	-	Estudio sobre la variación de los isómeros del Trp en alimentos irradiados	-	127
Trp	Columna de intercambio catiónico Amino-Na 6.0 x 10 cm	Tampón citrato pH 9.3	FLD Derivatización port-columna con OPA	-	90-95%	Hidrólisis alcalina con NaOH 4.2 M	Lisozima	74

Tabla 11 (Continuación). Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Isómeros 4,5,6,7-hidroxi triptófano, Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Hys, Ile, Leu, Lys, met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Columna C ₁₈ Nucleosil 120-3 RP 250 × 4 mm	TFA (0.1 %)/ acetonitrilo (84:16, v/v)	Detección electroquímica (750 mV)	~ 4 µg·L ⁻¹	-	Estudio sobre la variación de los isómeros del Trp en alimentos irradiados	Camarones	264
Trp y aminas neuroactivas	Columna C ₁₈ Zorbax SB 2.1 x 150mm,	Acetonitrilo /ácido fórmico 0.2 % (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	-	-	Extracción suave en vortex con ácido ascórbico 1 mM	Cerebro de rata	75
Asp, Glu, Asn, Ser, His, Thr, Gly, Hyp, Arg, Tyr, Ala, , Pro, Trp, Val, Met, Ile, Leu, Phe	Columna Thermo Hypersil 250×4.6m	Acetonitrilo:acetato sódico/metanol: acetato sódico (gradiente)	DAD-FLD Derivatización con OPA-ET-FMOC	-	90-105 %	Extracción asistida por ultrasonidos en medio ácido suave	Queso	76
Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Hys, Leu, Ile,Lys, Met,Phe, Pro,Ser, Thr, Tyr, Trp, Val	Columna semicapilar Zorbax Bonus-RP 100 × 2.1 mm	Ácido acético 0.01mM en solución acuosa de ácido fórmico 0.2%	APCI-MS Modo SCAN	-	79-91 %	Extracción asistida por ultrasonidos en medio ácido acético 0.2 M	Formulaciones infantiles, frutas y zumos	265
Phe	Columna C ₁₈ 50 x 4.6mm	Acetonitrilo/agua acidificada con ácido acético (50:50, v/v)	UV-FLD Derivatización con FMOC	-	-	Hidrólisis gástrica simulada en HCl 0.01 M	Aspartame	266

Tabla 11 (Continuación). Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
His, Asn, Gln, Ser, Arg, Asp, Gly, Glu, Thr, Ala, Pro, Met, Val, Cys, Lys, Ile, Leu, Phe, Tyr	Columna Monolítica en base sílice MonoClad C ₁₈ -HS 250 × 3 mm	Agua/acetonitrilo/ TCA (gradiente)	FLD Derivatización pre-columna con NBD-F	2.94 - 53.4 fmol.	93-107%	Extracción y derivatización simultanea en medio tampón borato 0.2 M	Plasma de ratón	267
Gly, Lys, Arg, Thr, Pro, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp	Columna C ₁₈ Aqua 250×4.6 mm	Acetonitrilo/Solución acuosa de ácido acético (gradiente)	Detector de conductividad	1-40 µM	-	Estudio del efecto de varios gradientes sobre la separación de los analitos	-	268
5-hydroxytryptófano	Columna C ₁₈ YMC, 250×2 mm	Agua /acetonitrilo (7:93, v/v)	ESI-MS Modo SIM	0.2 ng	97-100%	Extracción asistida por ultrasonidos en medio acuoso y posterior dilución	Suero de rata	269
Trp, 5-hydroxytryptófano y serotonina	Columna de intercambio iónico	-	FLD Derivatización post-columna con OPA	-	-	Hidrólisis básica con NaOH 2 N	Cafe tostado	270
Trp, serotonina y otras aminas biogénicas	TLC	Metanol/amonio (28%) (100:1.1, v/v)	FLD	10-30 ng		Extracción en vortex con tetraborato sódico	Orina humana	271
Trp, serotonina y otras aminas biogénicas	Columna C ₁₈ Novapak -C18 150 x 3.9 mm	Acetonitrilo/tampón fosfato amónico (gradiente)	ESI-MS (Modo SCAN)	-	68-98%	Hidrólisis ácida en ácido perclórico 0.4 M	Chocolate	61

Tabla 11 (Continuación). Determinación no quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Serotonina y otras aminas biogénicas	Columna monolítica C ₁₈ Onyx 100×3.0mm	Acetonitrilo /ácido fórmico 0.1 % (gradiente)	ESI-MS/MS (Modo SRM)	~ 1.2 ng·g ⁻¹	~ 100 %	Extracción suave en medio metanólico	Frutas	272
Trp	Columna C ₁₈ Zorbax 3 x 250 mm	acetato sódico 0.1 M (ácido acético 0.1 M/metanol (42.5:42.5:15; v:v:v)	FLD -	-	-	Extracción asistida con ultrasonidos en agua y posterior filtración	Semillas de cacao	273
Serotonina	Columna C ₈ Zorbax Eclipse-150×4.6 mm	Acetonitrilo /ácido fórmico 0.1 % (gradiente)	UV-ESI-MS (Modo SIM)	-	-	Aplicación del diseño experimental para la optimización de la cantidad de PI	Fluido intestinal	274
Serotonina y otros neurotransmisores	Columna Discovery HS F5 150 × 4 mm,	Metanol/formiato amónico 5 mM pH 3.4 (gradiente)	UV-ESI-MS/MS Modo MRM	< 2.1 nM	-	Limpieza de muestra mediante SPE con cartuchos de modo mixto	Cerebro de rata	275
Trp, serotonina y otras aminas biogénicas	Columna C ₁₈ Nova-Pak 15 ×0.39 cm	Metanol/acetato de sodio 10 mm (gradiente)	PAD	0.02-0.7 mg·L ⁻¹	77-102 %	Eliminación de las grasas y extracción con ácido perclórico en ultrasonidos	Chocolate	276
Serotonina	Columna monolítica C ₁₈ Onyx 100×3.0mm	Metanol/ácido fórmico 0.2% (gradiente)	ESI-MS/MS Modo MRM	1.5 nmol·L ⁻¹	98 %	Extracción por agitación en Vortex	Plaquetas humanas	277
Serotonina, melatonina y auxina	Columna C ₁₈ Xterra 1000 ×2.1 mm,	Acetonitrilo/ácido acético 0.45% (gradiente)	APPI-MS Modo SCAN	100 pg·mL ⁻¹	89 %	Extracción asistida por ultrasonidos en medio metanólico	Plantas	278

5.1.2. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIONICOS Y AMINOACIDOS MEDIANTE MÉTODOS DE SEPARACIÓN NO CROMATOGRÁFICOS.

Entre los métodos de separación no cromatográficos cabe destacar los **métodos electroforéticos**. Las primeras separaciones por electroforesis, sobretodo en el caso de aminoácidos, se realizaron mediante electroforesis en papel o de capa fina (celulosa o gel de sílice). A causa de sus diferentes valores de pKa los aminoácidos migran en direcciones diferentes a distintas velocidades, que dependen del pH del sistema y de la fuerza electromotriz aplicada (28).

En los últimos años, la separación de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos también se ha llevado a cabo mediante métodos basados en **electrocromatografía capilar** (CEC), **cromatografía electrocinética micelar** (MEKC), **electroforesis capilar** (CE), **inmunoensayos o biosensores**, aunque en la actualidad, los métodos cromatográficos continúan siendo los más utilizados.

La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica recientemente aplicada al análisis de pesticidas que utiliza un capilar de sílice fundida relleno con una solución electrolítica, dentro del cual se genera un flujo electro-osmótico que hace que todos los iones, incluso las especies cargadas negativamente, migren hacia al cátodo. Algunas de las ventajas de los métodos basados en CE son su simplicidad, los pequeños volúmenes de muestra y disolvente, la fácil automatización y el bajo coste del capilar, mayor resolución y capacidad de pico y menor tiempo de análisis, y facilidad de acoplamiento con la espectrometría de MS.

La electroforesis, se ha acoplado satisfactoriamente a distintos detectores como el UV o la fluorescencia de láser inducida (279, 280). Actualmente la electroforesis capilar se acopla a espectrometría de masas con ionización de electrospray, resultando una técnica muy útil para el análisis de agroquímicos en muestras medioambientales (281). Messina y col, llevaron a cabo con éxito la separación del diclofop, haloxyfop, fenoxaprop y fluazifop mediante electrocromatografía capilar evaluando distintas fases estacionarias monolíticas de 100 µm y fases móviles mezclas de metanol/acetonitrilo (282).

La electroforesis capilar acoplada a la detección UV se ha aplicado satisfactoriamente al análisis de aminoácidos libres en carnes de cerdo e hidrolizados de proteína (283-284). Otra posibilidad análisis de aminoácidos es el acoplamiento de la electroforesis capilar a la detección de fluorescencia inducida por láser (LIF) (285-286). La electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas ha permitido el análisis de aminoácidos y sus metabolitos en matrices complejas y a concentraciones bajas. La interfase más utilizada ha sido ESI (287) destacando el uso de analizadores de tiempo de vuelo. Así, por ejemplo, Peterson y col. determinaron con éxito la serotonina y sus precursores, triptófano y e hidroxitriptófano mediante ESI-TOF-MS en plasma a niveles de detección de nmol (288).

Dentro de la CE, la técnica más importante ha sido la cromatografía electrocinética micelar (MECK), donde se añade al electrolito de fondo un tensoactivo en concentración superior a su concentración micelar crítica, de forma que se produce la interacción de los analitos con las micelas formadas. Gracias a los avances tecnológicos, actualmente la cromatografía electrocinética micelar es una de las herramientas más poderosas para el análisis de aminoácidos en distintas matrices (289, 290).

5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUIRAL

El contenido enantiomérico de una mezcla de estereoisómeros se puede expresar de distintas maneras. Cuando la técnica de análisis es la polarimetría es habitual expresarlos como **pureza óptica P (%)**, según la siguiente fórmula:

$$Ec [2] \quad P(\%) = \left(\frac{\alpha}{\alpha_{\max}} \right) \times 100$$

Donde α_{\max} es el poder óptico rotatorio específico del compuesto puro y α el poder óptico rotatorio específico de la mezcla.

Si en la mezcla, uno de los enantiómeros está presente en mucha mayor proporción que otro, los parámetros utilizados son el **exceso enantiomérico (e.e)** definido como:

Ec [3]

$$e.e.(%) = \left[\frac{(R - S)}{(R + S)} \right] \times 100$$

Dónde R y S son las concentraciones del enantiómero R-(+) y S-(-) respectivamente.

O la **pureza enantiomérica (p.e)** expresada como:

Ec [4]

$$p.e.(%) = \left[\frac{R}{(R + S)} \right] \times 100$$

Siendo el enantiómero S-(-) el minoritario en ambos casos.

Cuando la separación de los enantiómeros se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas, el parámetro utilizado, sobretodo en estudios medioambientales, es la **relación enantiomérica (ER)** definida como:

Ec [5]

$$ER = \frac{\text{Área}_1}{\text{Área}_2}$$

Dónde Área 1 y Área 2 corresponden al área del pico cromatográfico del primer y segundo enantiómero eluido respectivamente. De esta expresión se puede deducir que para una mezcla racémica donde la concentración de los enantiómeros es la misma, el valor de ER es aproximadamente 1.

Sin embargo, muchas veces la utilización de este parámetro puede dar lugar a resultados confusos pues tal y como está definido el parámetro ER puede variar desde 0 hasta infinito. Ante esta situación muchos autores prefieren el uso de la llamada **fracción enantiomérica (EF)**, definida como

Ec [6]

$$EF = \frac{\text{Área}_1}{\text{Área}_1 + \text{Área}_2} = \frac{ER}{ER + 1}$$

El valor de EF puede oscilar desde 0 hasta 1 siendo 0.5 el valor típico de mezclas racémicas (291).

Los diversos métodos de análisis de sustancias quirales se pueden clasificar en técnicas instrumentales sin separación basadas únicamente en la interacción de los

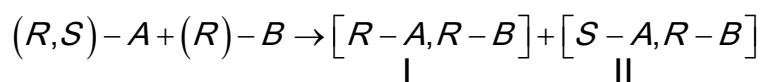
analitos puros con un haz de luz polarizada (**técnicas quirópticas**) o en **técnicas de separación** tanto no cromatográficas como cromatográficas. En esta clasificación se puede establecer un segundo criterio basado en el fundamento de la determinación, distinguiendo así los métodos que necesitan de un auxiliar quiral para proporcionar información analítica de los enantiómeros y los que no. Estos últimos, son métodos basados en técnicas inherentemente quirales como las quirópticas. El resto de técnicas analíticas necesitan de la interacción con un auxiliar quiral (140).

Dado que parte del trabajo realizado en esta memoria se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida quiral, y en concreto mediante el empleo de fases estacionarias quirales, será ésta la técnica que se describirá en detalle.

5.2.1. METODOS CROMATOGRÁFICOS DE DETERMINACIÓN QUIRAL

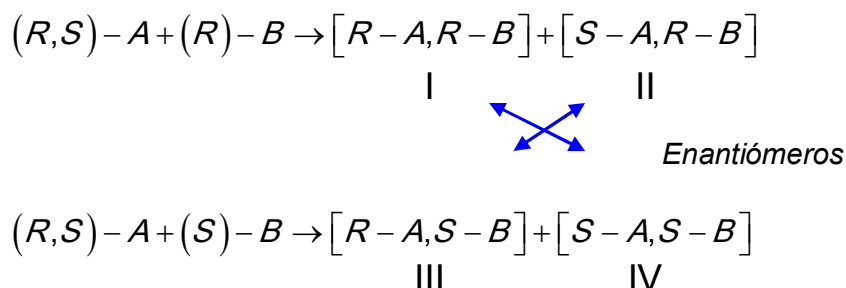
5.2.1.1. DETERMINACIÓN INDIRECTA

Hasta la mitad de los años ochenta, los empaquetamientos y las fases estacionarias disponibles no permitían la separación de mezclas racémicas, puesto que los enantiómeros al poseer idénticas propiedades físicas y químicas, no se podían distinguir mediante técnicas cromatográficas convencionales. Las primeras separaciones cromatográficas quirales se llevaban a cabo mediante métodos indirectos, los cuales se basan en la reacción de los enantiómeros con un **auxiliar quiral ópticamente puro**, obteniéndose así una mezcla de diastereoisómeros:



Dónde R y S representan a los enantiómeros R-(+) y S-(-) respectivamente. Las especies I y II, al poseer propiedades físicas distintas, pueden separarse haciendo uso de una separación cromatográfica convencional ya sea en fase inversa o en fase normal, obteniéndose dos picos resueltos en mayor o menor medida. En el caso que la reacción tenga lugar con el otro enantiómero del auxiliar quiral, es decir con (S)-B, el orden de elución de los diastereoisómeros formados se podría invertir. Este método presenta los inconvenientes de cualquier proceso de derivatización, es decir aumento de tiempo de análisis y del coste del proceso, condiciones de reacción muy estrictas, derivatizaciones incompletas, etc. Pero es sin duda, la necesidad de un auxiliar quiral de elevada pureza y especificidad lo que limita en muchas ocasiones el uso de la cromatografía quiral indirecta.

Supongamos que se dispone de un auxiliar quiral que no es enantioméricamente puro, en este caso las reacciones que se producirían serían las siguientes:



En este caso se formarán cuatro especies pero únicamente en el cromatograma se observarán los picos correspondientes a I y II (diastereoisómeros), pero cada uno de ellos contendrá solapados a sus respectivos enantiómeros IV y III. En definitiva, cuando el auxiliar quiral no es ópticamente puro, este tipo de procesos llevarán implícitos un error en la determinación, lo que limita más el número de auxiliares quirales disponibles y favorece que el método directo sea el más utilizado (292).

Aunque estas reacciones de derivatización se llevan a cabo en condiciones controladas y se asume que no existen racemizaciones, algunos autores como Péter y col. (293), Ilisz y col (294) o Srinivas (295) sostienen que en muchas ocasiones durante la reacción de los enantiómeros de aminoácidos con el auxiliar quiral se pueden producir racemizaciones en una extensión del más de 0.1 % o que a menudo, las proporciones de reacción de los enantiómeros pueden ser diferentes y por tanto la formación de los diastereoisómeros puede llevarse a cabo en distinta proporción a la de los enantiómeros originales.

En el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, pocos son los trabajos recogidos en la bibliografía que empleen este tipo de metodologías para el análisis quiral. Se ha propuesto como agente derivatizante el ácido clorado de la (S)-(-)-N-trifluoroacetilprolina para el análisis quiral de herbicidas que contengan en su estructura grupos amino o alcohol (296).

Respecto a los aminoácidos, este método es todavía ampliamente utilizado en su análisis quiral debido principalmente a la gran cantidad de auxiliares quirales disponibles que proporcionan reacciones de derivatización bien establecidas, lo cual

conduce a la formación de diastereoisómeros fácilmente separables y detectables mediante cromatografía convencional.

Las reacciones de derivatización, habitualmente tienen lugar con los grupos amino de los aminoácidos. Los auxiliares quirales más utilizados se pueden dividir en varios grupos entre los que destacan los ácidos carboxílicos activados y derivados, cloroformatos, isocianatos e isotiocianatos, derivados del N-haloarilaminoácido y combinaciones de OPA con agentes tiolados quirales, siendo los diastereoisómeros formados más habituales amidas, uretanos, urea, derivados de la tiourea, etc. (295).

Así, Gil-Díaz y col. (77) y Barroso y col (297-298), han llevado a cabo la determinación de D-aminoácidos en concentraciones próximas a ng en diversos alimentos (jamón cocido, ostras y leche) y preparados farmacéuticos utilizando como auxiliar quiral OPA-NALC (N-acetil-L-cisteína), mientras que D'aniello y col (299) utilizaron la misma reacción de derivatización para la determinación de D-Asp en cerebro de rata. Hess y col (300) determinaron enantiómeros de aminoácidos etoxilados utilizando OPA-IBLC. Fisher y col. (301) y Csapó (302), utilizaron OPA en combinación con β -mercaptoetanol y tetraacetato de tiol- β -D-glucosa para la determinación de D-aminoácidos en fluidos biológicos. Estos reactivos resultan ventajosos cuando se quieren seguir procesos de oxidación o racemización de algún aminoácidos (294).

La derivatización con tiocianatos e isotiocianatos también es bastante frecuente (300, 303). La derivatización con isocianatos generalmente requiere condiciones de reacción más severas (tiempos largos y altas temperaturas) que los isotiocianatos para una reacción completa, de ahí que sean menos utilizados que los anteriormente mencionados.

El reactivo de Marfey (FDAA, N-(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alanina amida) proporciona muy buenos resultados para aminoácidos neutros. Sin embargo la reacción de este reactivo con aminoácidos básicos da como resultado tres productos, lo que hace que la correcta determinación de los diastereoisómeros en ocasiones no sea posible (300). Aún así, ha sido utilizado con éxito para la determinación de D-Ala, D-Pro y D-Ser en saliva humana (304). Ante las limitaciones de este reactivo, muchos autores han optado por sintetizar variantes como el difluorodinitrobenzo (DFDNB) aplicado con éxito en la determinación de enantiómeros de aminoácidos tanto proteicos como no proteicos (305).

En cuanto a la separación cromatográfica, en la mayoría de los casos se lleva a cabo mediante cromatografía en fase inversa utilizando columnas C_8 o C_{18} . Las fases móviles se basan en mezclas de agua o un medio tamponado y disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo y THF) utilizando en la mayoría de los casos elución en gradiente.

5.2.1.2. DETERMINACIÓN DIRECTA

Las separaciones cromatográficas quirales directas se basan en la interacción diferencial de un auxiliar quiral con los enantiómeros del analito formando complejos diastereoisoméricos transitorios fruto de un equilibrio dinámico.

Este auxiliar quiral bien se puede añadir a la fase móvil, o puede formar parte de la propia columna. En el primer caso se trata de añadir continuamente un compuesto enantioméricamente puro a la fase móvil conocido como **aditivo quiral de la fase móvil (CMPA)**, formándose un complejo diastereoisomérico transitorio entre el auxiliar quiral y el analito que resulta fácilmente separable. El problema de esta estrategia es que estos CMPA suelen ser bastante selectivos y en algunos casos no resulta una alternativa económica dependiendo de que analitos se quieran analizar.

La introducción de fases estacionarias quirales desde el año 1980 permitió la resolución directa de los enantiómeros por formación de diastereoisómeros temporales entre los enantiómeros de la muestra y la fase estacionaria, constituyendo las diferencias de estabilidad de los diastereoisómeros formados la base de la separación. En la actualidad, se han comercializado más de 100 **fases estacionarias quirales (CSP)**. Normalmente se utilizan partículas poliméricas o de sílice como materiales soporte a los que se une física, covalente o iónicamente la fase estacionaria quiral.

La capacidad de un analito y de la fase para formar un complejo transitorio depende de la formación de enlaces de hidrógeno, de interacciones π - π , dipolos, interacciones estéricas y complejos de inclusión. Para que dos enantiómeros se resuelvan es necesario que ocurran un mínimo de tres interacciones, una de las cuales debe ser al menos estereoquímicamente dependiente (figura 11). En algunos casos la separación también depende de la temperatura, del pH y de la naturaleza del tampón de la fase móvil. Por otra parte, la temperatura puede producir cambios conformacionales en la estructura de las CSP, lo que afecta a la geometría de los

centros responsables de la discriminación estérica pudiendo producir cambios en la selectividad. La capacidad de los métodos de HPLC para separar dos enantiómeros se mide a través de la enantioselectividad (α), que debe tener un valor superior a 1.1 (140, 292). Actualmente se encuentran disponibles una amplia variedad de fases estacionarias quirales, siendo de destacar las descritas en la tabla 12.

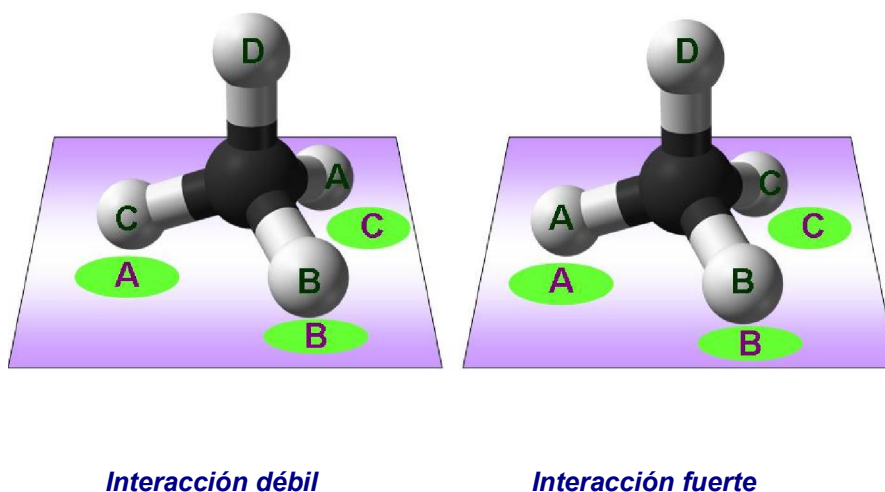


Figura 11. Esquema de la interacción mediante tres puntos de dos enantiómeros con un selector quiral

A continuación se describirán las características más importantes de cada una de ellas, haciendo especial hincapié en aquellas fases estacionarias quirales basadas en glicoproteínas y antibióticos macrocíclicos utilizadas en el desarrollo de esta tesis doctoral.

Tabla 12. Principales fases estacionarias quirales

TIPO	MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO	CARACTERÍSTICAS DEL ANALITO	TIPO DE FASE MÓVIL
Proteínas	Interacciones hidrofóbicas y electrostáticas	Grupos ionizables, grupos aromáticos	Fase inversa
Ciclodextrinas	Inclusión-complejación, enlaces de hidrógeno	Grupos aromáticos y polares	Fase inversa y fase normal
Polisacáridos	Inclusión-complejación, interacciones atractivas	Capacidad de formación de enlaces de hidrógeno	Fase inversa y fase normal
Pirkle	Enlaces de hidrógeno, dipolos, interacciones π - π	Capacidad de formación de enlaces π o hidrógeno	Principalmente fase normal, en fase inversa menor resolución
Intercambio de ligandos	Complejos de coordinación a metales	α -amino o α -hidroxiaminoácidos	Fase inversa
Antibióticos macrocíclicos	Enlaces de hidrógeno, dipolos, interacciones π - π , impedimentos estéricos, interacciones hidrofóbica	Capacidad de formación de enlaces π , dipolos o enlaces de H	Fase inversa, fase normal, modo POM, modo PIM
Éteres corona	Interacción ión-dipolo	Iones metálicos o grupos amino primarios	Fase inversa

a) Polisacáridos

Los derivados de celulosa y amilasa muestran excelentes propiedades como CSP. Contienen unidades de cadenas lineales de glucopiranosas enlazadas unas a otras mediante enlaces 1,4-glicosídico, que se agregan en estructuras regulares con propiedades cristalinas y una estructura helicoidal ordenada. La mayoría de las columnas comerciales disponibles se utilizan en modo normal y poseen una eficacia moderada, normalmente inferior a las de proteína. Algunas de las ventajas que presentan son su alta capacidad de carga y la facilidad para llevar a cabo separaciones preparativas, aunque la mayoría de ellas requieren muestras y disolventes libres de agua. Las fases móviles más habituales en este tipo de columna son mezclas de hexano con 2-propanol, aunque alcoholes de mayor peso molecular pueden proporcionar valores más altos de α , puesto que tienen menor tendencia a la interacción mediante enlaces de hidrógeno con la fase estacionaria, proporcionando

una resolución mayor en compuestos que también compiten por estos sitios quirales activos (292, 306-307).

b) Fases tipo Pirkle

Este tipo de fases estacionarias dadoras-aceptoras, están formadas en general mediante enlace covalente de un derivado de aminoácido ópticamente puro a un γ -aminopropil silanizado en base gel de sílice. El mecanismo de retención se basa en el enlace preferencial de uno de los enantiómeros a la fase estacionaria a través de una combinación de enlaces π - π , enlaces de hidrógeno, interacciones estéricas y dipolos inducidos. Las CSP tipo Pirkle se caracterizan por su estabilidad, exhibiendo buena enantioselectividad para un gran número de compuestos, entre los que destacan algunos tipos de drogas, productos farmacéuticos y aminoácidos, siendo las fases móviles más empleadas en la resolución quiral a escala preparativa (292).

La fase más utilizada ha sido la 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, que ha resultado adecuada para resolver enantiómeros de compuestos aromáticos, que son considerados buenos dadores π . Como fase móvil se suelen utilizar mezclas de un disolvente no polar como hexano, con un disolvente polar como isopropanol o etanol. Sin embargo, con el desarrollo de fases estacionarias de última generación la utilización de CSP tipo Pirkle en fase inversa se está imponiendo como tendencia actual (308).

c) Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son carbohidratos cíclicos quirales que contienen seis, siete u ocho unidades de D-(+)-glucopiranosas conectadas entre sí mediante enlaces 1,4- glicosídicos. Poseen una superficie externa hidrofílica por la presencia de grupos hidroxilo primarios en posición 6 y secundarios en posición 2 y 3, y una estructura de toroide hueco truncado que permite la entrada de la parte hidrofóbica de los analitos a la cavidad interna, la cual presenta diferentes profundidades en función del número de unidades de glucopiranosas (α , β y γ - ciclodextrinas).

Cuando se utilizan con disolventes de fase inversa el mecanismo de retención es sobre todo de inclusión-complejación y de enlaces de hidrógeno. Estas interacciones necesitan que el analito contenga al menos una parte hidrofóbica para que pueda penetrar en la cavidad. Por lo general, cuanto más hidrofóbico es el analito

en cuestión, la afinidad por la cavidad interna es mayor y el complejo de inclusión formado es más estable. Cuando se trabaja en fase normal la fase móvil ocupa la cavidad y el soluto interacciona con los grupos hidroxilos secundarios superficiales, por lo que la retención depende fundamentalmente de los enlaces de hidrógeno que se forman. Si las condiciones de trabajo son en fase inversa, se piensa que el reconocimiento quiral viene dado por la formación de complejos de inclusión entre el resto hidrófobo del analito y el interior hidrofóbico de la ciclodextrina (292, 308).

d) Proteínas inmovilizadas

Algunas proteínas como la albúmina de suero humano y bovino, α_1 -glicoproteína, ovomucoide, celulasa, pepsina, penicilina G-acilasasa, avidina, ovotransferrina, quimotripsina, etc. se han enlazado covalentemente a soportes poliméricos y de sílice para formar CSP disponibles comercialmente. Como principales ventajas cabe destacar su compatibilidad con fases móviles altamente acuosas tamponadas y la capacidad de separación de un gran número de analitos.

Por otra parte, los mecanismos de separación son complejos debido a la diversidad de las características estructurales de la proteína, sus conformaciones y el número de centros quirales que presentan lo que les hace ser a su vez extremadamente delicadas y de elevado precio en el mercado. Las principales interacciones que se ponen de manifiesto son las hidrofóbicas y electrostáticas, aunque las interacciones de transferencia de carga, los enlaces de hidrógeno y la inclusión en la estructura tridimensional de la proteína también pueden contribuir a la selectividad quiral. Además, puesto que la proteína inmovilizada posee un determinado valor de punto isoelectrónico, el pH de la fase móvil se debe ajustar para controlar la retención. Con fases móviles acuosas, en general la retención disminuye con el incremento de temperatura y aumenta con la disminución de proporción de modificador orgánico (309, 310).

Una de las CSP proteicas más utilizada en la separación enantiomérica de herbicidas es la ***α_1 -glicoproteína ácida (AGP)***. Las AGP son polipéptidos que contienen 181 restos de aminoácidos y 14 restos de ácido siálico incorporados en la porción de carbohidratos de la molécula. Esta fase estacionaria de AGP trabaja con fases móviles acuosas tamponadas / orgánicas, utilizando como modificador orgánico bien 1-propanol ó 2-propanol (1-10%), un pH entre 3 y 8 y concentraciones de tampón comprendidas entre 20-100 mM. La temperatura de operación suele ser la

temperatura ambiente, inferior o ligeramente superior ya que a temperaturas altas el valor del factor de retención (k) para ambos enantiómeros decrece perdiendo poder de enantioresolución, además de favorecer tanto la racemización de algunos compuestos quirales como la desnaturalización de la propia proteína (311).

Normalmente un incremento en la proporción del modificador orgánico, reduce tanto la retención como la enantioresolución, aunque en algunos casos se puede dar la situación contraria. Este efecto probablemente se debe a que el proceso global de retención es controlado en gran medida por las interacciones dispersivas mientras que la enantioselectividad resulta de las interacciones polares con los grupos próximos a los centros quirales. Cuando la cantidad de modificador orgánico se incrementa, las interacciones dispersivas en la fase móvil aumentan reduciendo la fuerza relativa de las interacciones dispersivas en la fase estacionaria. Se observa un efecto similar cuando la concentración de tampón se incrementa, aumentando así las interacciones iónicas de la fase móvil (311).

Según los datos del recogidos por Félix (312), las fases estacionarias basadas en AGP ofrecen buenas enantioresoluciones para herbicidas de distintas familias entre las que destaca la de los ariloxifenoxipropiónicos.

e) Antibióticos macrocíclicos

El uso de antibióticos macrocíclicos como selectores quirales se introdujo por primera vez en 1994 por Armstrong y col. (313). Son compuestos eficaces tanto en forma ionizada como en forma molecular y muestran buena enantioselectividad para una amplia variedad de analitos como aminoácidos biológicos y sintéticos, drogas sintéticas ácidas y básicas, etc. Por lo general, son más estables y muestran capacidades mayores que las CSP de proteína y mayores eficacias que las de ciclodextrina, por tanto están particularmente indicadas para cromatografía preparativa.

Dichas fases estacionarias pueden ser utilizadas tanto en fase normal, fase inversa, modo orgánico polar (POM) o modo iónico polar (PIM) sin que ello suponga un cambio irreversible de enantioselectividad. Presentan una serie de características estructurales que les hace especialmente útiles para su interacción con solutos quirales, siendo capaces de asociarse a ellos mediante interacciones iónicas, π - π , hidrofóbicas, dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. Poseen numerosos grupos

funcionales hidrofílicos e ionizables que les hace solubles en disoluciones acuosas, y además poseen baja o nula absorción en el espectro UV-VIS. Sus principales propiedades físicas y químicas se muestran en la tabla 13 (308).

Tabla 13. Características fisicoquímicas de las principales CSP de antibióticos glicopeptídicos

Tipo	Peso (Da)	Centros Asimétricos	Nº Cavidades de Inclusión	Nº de Carbohidratos	Grupos Ionizables*
Teicoplanina	1878	20	4	3	2
Ristoceina A	2066	38	4	6	2
Vancomicina	1448	18	3	2	3

**grupos ionizables incluyendo ácidos carboxílicos y aminos pero excluyendo grupos fenol.*

Todos estos antibióticos macrocíclicos están formados por moléculas de carbohidratos y por una porción aglicónica, la cual adopta forma de cesta y consta a su vez de tres o cuatro anillos macrocíclicos aromáticos fusionados, formados cada uno de ellos por grupos amino enlazado y fenoles sustituidos. Los azúcares unidos a la cesta tienen libertad de rotación y se pueden orientar de forma diferente. Entre sí, los antibióticos glicopeptídicos difieren en el número y tipo de grupos carbohidrato colgante. A diferencia del resto, la **teicoplanina**, cuya estructura química se puede observar en la figura 12, es la única que presenta una cadena hidrofóbica acilo unida a un grupo 2-amino-2-deoxi- β -glucopiranosil. La característica estructural más importante de la teicoplanina es la cadena lateral hidrofóbica unida a un resto 2-amino-2-deoxi-(R)-D-glucopiranosil, que hace que la superficie de este antibiótico sea activa y pueda formar micelas, comportamiento que únicamente se manifiesta en este antibiótico, siendo su concentración micelar crítica en solución acuosa de 0.18 mM. A consecuencia de esta estructura molecular, la teicoplanina es ligeramente menos soluble en agua que el resto de antibióticos glicopeptídicos. Su punto isoelectrico es de 3.5, lo que hace que en el intervalo de pH habitual de trabajo (pH 3-7), muestre cierto carácter aniónico, al contrario que la vancomicina o ristocetina que muestran carácter catiónico, lo que le da propiedades únicas frente a una gran variedad de compuestos.

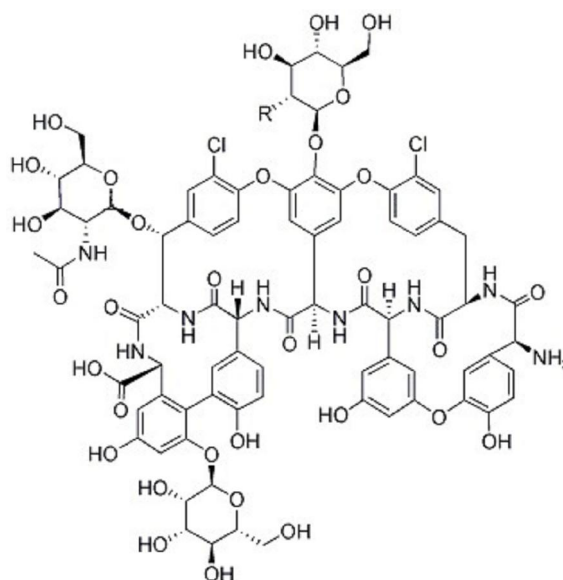


Figura 12. Estructura química de la teicoplanina disponible comercialmente.

En su estructura coexiste tanto un grupo amino primario como un grupo carboxílico con valores de pKa de 9.2 y 2.5 respectivamente y dos grupos amino sacáridos ambos *N*-acetilados, mientras que la vancomicina y la ristocetina poseen un grupo amino libre adicional unido a un resto amino sacárido el cual afecta tanto a la carga y como a su comportamiento. Por otra parte, la teicoplanina posee restos de monosacáridos y grupos fenólicos que le proporcionan sitios hidrogenados para los analitos quirales. El carácter menos polar del interior de la bolsa aglicona y la cadena lateral, le proporcionan sitios de interacción hidrofóbica (308).

En cuanto a las condiciones de operación, la teicoplanina admite medios tamponados, disolventes orgánicos, o aminas que modifican el reconocimiento quiral. Las concentraciones de tampón que proporcionan una enantioresolución máxima se suelen encontrar comprendidas entre 1-5 mM. Se ha comprobado que la enantioresolución de muchos compuestos se mejora e incrementa cuando aumenta la proporción de modificador orgánico en la fase móvil (>20 %), ya que se cree que el modificador orgánico reduce o inhibe la capacidad de agregación de la teicoplanina favoreciendo las interacciones enantioespecíficas (314).

La **teicoplanina aglicona** posee la misma estructura que la teicoplanina pero únicamente contiene la porción aglicona de la misma, de tal manera que el número de centros estereogénicos y de grupos hidroxilo disminuye, lo que no significa que la selectividad quiral se vea afectada o desciende por la pérdida de restos azucarados.

El antibiótico **vancomicina** es muy soluble en agua y disolventes polares apróticos, pero poco soluble o insoluble en alcoholes y disolventes orgánicos menos polares. En solución acuosa se puede dimerizar dependiendo del tipo de disolución y de su concentración, aunque es estable a baja temperatura en el intervalo de pH 3-6. Su elevado peso molecular limita el proceso de difusión, lo que aumenta la eficacia de la separación. Este selector quiral ha demostrado ser adecuado en el reconocimiento enantiomérico de compuestos aniónicos, especialmente aquellos que contienen grupos carboxílicos, cuyo mecanismo de retención se encuentra basado probablemente en la interacción con los grupos amino de su estructura. De hecho, las mejores separaciones se han obtenido con tampones ácidos a valores de pH cercanos o por debajo de su punto isoeléctrico que es 7.2 (295, 308).

La **ristocetina** es el antibiótico macrocíclico con mayor número de centros estereogénicos. Contiene 7 anillos aromáticos, 6 anclajes amida, 21 grupos hidroxilo, dos grupos amino primarios y un grupo metil éster. Su punto isoeléctrico está próximo a 7.5, lo que significa que en las condiciones normales de trabajo (pH 3.5-7.5), mostrará comportamiento catiónico tal y como se ha comentado anteriormente. Este antibiótico contiene tres grandes cavidades, y es la alternativa para aquellos compuestos que no se pueden resolver mediante el uso de vancomicina (308).

Gracias a la versatilidad de operación que ofrecen estas columnas, algunas casas comerciales ofrecen kits con fases estacionarias de teicoplanina, teicoplanina aglicona, vancomicina y ristocetina, para desarrollar protocolos de separación quiral estudiando de manera secuencial distintos modos cromatográficos (315).

f) Otras fases

Las fases estacionarias denominadas de **bajo peso molecular o “Brush-Type”** están formadas por moléculas quirales distribuidas de manera uniforme en la superficie de una matriz idealmente inerte, fácilmente accesibles por las moléculas de los analitos a separar. Estos materiales son química y térmicamente inertes, presentan buenas propiedades cinéticas, un amplio intervalo de aplicación y en general, son compatibles con cualquier fase móvil (292).

Los **éteres corona** son poliéteres macrocíclicos que forman complejos de tipo “host-guest” con metales alcalinos, alcalinotérreos y cationes de amonio. El mecanismo de reconocimiento quiral de estas fases se postula en la formación de

enlaces de hidrógeno entre los tres hidrógenos unidos al nitrógeno del grupo amino y los oxígenos del éter macrocíclico (308).

La separación quiral mediante **intercambio de ligandos** se basa en la unión covalente de un ligando ópticamente activo (generalmente un aminoácido) a un soporte sólido. La separación de los enantiómeros presentes se lleva cabo en función de su diferente capacidad para desplazar a dicho ligando en reacciones de complejación con iones metálicos. Las fases estacionarias más comunes contienen L-prolina enlazada a una base de sílice. El reconocimiento quiral tiene lugar después de hacer pasar por la fase estacionaria una disolución que contiene un catión divalente, generalmente Cu^{2+} . Estos iones quedan retenidos inicialmente en la columna por complejación con la L-prolina inmovilizada. Al llevar a cabo la elución, los enantiómeros quedan más o menos retenidos en función de la diferente capacidad de complejación con los iones Cu^{2+} unidos a la fase estacionaria. El inconveniente de estas fases estacionarias es la falta de universalidad y únicamente han mostrado resultados satisfactorios en el caso de aminoácidos o amino alcoholes (316).

5.2.1.2.A) DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA QUIRAL DIRECTA

Respecto a la separación quiral de mezclas racémicas de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía quiral directa, las primeras tentativas tuvieron lugar mediante el uso de aditivos quirales a la fase móvil y utilizando columnas convencionales de octadecilsilano (ODS). Davy y col. (317) en los años 80, llevaron a cabo la separación de los enantiómeros del fluazifop y fluazifop-butil mediante cromatografía en fase inversa, añadiendo a la fase móvil la L-prolil-n-octilamida-Ni (II) y obteniendo resoluciones intermedias apenas casi sin retención de los enantiómeros en la columna. Por otra parte, dicho selector quiral no resultó ser del todo eficaz para el reconocimiento quiral de otros herbicidas de la familia de los ariloxifenoxipropiónicos, por lo que los autores postularon que la progresiva pérdida de reconocimiento quiral era dependiente del número de átomos de cloro en el anillo fenoxi debido al efecto inductivo en el par de electrones del oxígeno del grupo éter (317).

En la actualidad la determinación quiral directa mediante el uso de fases estacionarias quirales es el método más habitual en el análisis de mezclas de

enantiómeros de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. De entre todas las fases estacionarias quirales disponibles, las basadas en celulosa o amilasa han sido ampliamente utilizadas en la separación quiral de diclofop, fluazifop, haloxyfop, quizalofop y fenoxaprop en condiciones de fase normal. Aprovechando los buenos resultados que proporcionaban dichas fases, muchos autores han optado por la posibilidad de modificar la celulosa en el propio laboratorio sintetizando CSPs basadas en fenilcarbamatos de celulosa, utilizadas frecuentemente por el grupo del profesor Wang y col (320) en el estudio de la degradación enantioselectiva del diclofop metil, y fenoxaprop-etil en diversas matrices.

Chunxiu y col (322) han llevado a cabo la separación de mezclas racémicas de diclofop, fluazifop, quizalofop y fenoxaprop mediante una CSP tipo Pirkle utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/propanol. Condiciones parecidas se han utilizado de igual manera para la enantioseparación de haloxyfop-metil, fenoxaprop-etil y diclofop-metil mediante CSP basadas en productos cristalinos de degradación de la vancomicina o tert-butilbenzoilato de tartardiamida. En algunos casos, estas separaciones mediante fase normal, proporcionan resoluciones pobres o bajas retenciones o requieren de largos tiempos de análisis para conseguir una resolución aceptable.

Sin embargo, las separaciones que emplean fase inversa aún siguen siendo escasas, Padiglione y col. (318) y Weber y col. (319) han empleado CSPs basadas en tergurida o β -ciclodextrinas permetiladas, en la enantioseparación del diclofop-metil, fluazifop-butil, haloxyfop y quizalofop. Mojtahedi y col (321) han utilizado también una β -ciclodextrina hidroxilada para la separación de los enantiómeros del fluazifop-butil y haloxyfop-etoxietil en fase inversa logrando resolución a línea base. Sin embargo, tal y como se ha comentado, muchos de estos métodos implican la síntesis de la CSP en el propio laboratorio, requiriendo tiempos de análisis de más de 45 min para obtener una resolución aceptable. Los enantiómeros del quizalofop-etil y fluazifop-butil, también han sido resueltos haciendo uso de fases móviles mezcla de metanol/agua o acetonitrilo/agua y la CSP de fenilcarbamato de celulosa que suele operar bajo condiciones de fase inversa (324).

En cuanto a la detección, la absorción UV (220-254 nm) sigue siendo la técnica más común dando excelentes resultados en la determinación de mezclas racémicas de herbicidas incluso en matrices complejas como alimentos o suelos. Aún así,

muchos autores se decantan por el uso del dicroísmo circular como método de detección.

En la tabla 14 se presentan los ejemplos más representativos recogidos en bibliografía sobre determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía quiral directa.

Tabla 14 .Determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Herbicidas	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
fluazifop-butil, haloxyfop, quizalofop-etil, diclofop, fenoxaprop-etil	Columna de tergurida en base sílice 150×4.6 mm	Acetonitrilo/acetato potásico 0.02M pH 3.5 (1:1, v/v)	UV (230 nm)	-	-	Enantioselectividad 1.09-1.20	-	318
diclofop-metil, fluazifop-butil y otros herbicidas fenoxiácidos	Columna de β - ciclodextrina permetilada Nucleodex β -PM 200×4 mm	Metanol/TEAA 0.4% (70:30, v/v)	DAD (233 nm)	-	-	El uso de TEAA previene la hidrólisis de los ésteres a la forma ácida Enantioselectividad próxima a la unidad	Suelos arcillos	319
fenoxaprop-etil, quizalofop-etil y siete herbicidas mas de distintas familias	Columna modificada con amilosa-tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol (90:10, v/v)	CD (222-440 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad 1.09-1.27	-	320
fenoxaprop-P- eti,haloxyfop-metill	Columna modificada con productos cristalinos de degradación de vancomicina 300×4.6 mm	Hexano/metanol/2- propanol (85:10:5, v/v/v) Hexano/2-propanol (90:10, v/v)	UV (280 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad 1.70-1.75	-	321
diclofop, fluazifop, quizalofop-P, fenoxaprop	Columna modificada con un derivado de celulosa y (S,S)-Whelk-O 1 300×4 mm	Hexano/isopropanol (90:10, v/v)	DAD (230-332 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad >1.1	-	322

Tabla 14 (Continuación). Determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Herbicidas	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
fluazifop, diclofop, fenoxaprop, haloxyfop	Columna monolítica capilar quiral (100 µm I.D)	Acetonitrilo/metanol/TEA -	UV (254 nm)	-	-	Preparación en el laboratorio de distintos monolitos Enantioselectividad próxima a la unidad	-	323
diclofop-metil, quizalofop-etil, quizalofop-P-tefuryl y herbicidas de distintas familias	Columna modificada amilosa-tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) 250×4.6 mm	Metanol/agua y Acetonitrilo/agua (100-60:0-40, v/v)	UV (230 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad en torno a la unidad	-	324
quizalofop-etil y herbicidas de distintas familias	Columna modificada amilosa-tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) 150×4.6 mm	Hexano/isopropanol (85-55:15-45, v/v)	UV (230 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad 1.24-1.98	-	325
diclofop-metil	Columna de celulosa CHIRALCEL OJ-H 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol (90:10, v/v)	CD (220 nm)	-	-	Estudio de relacion enantiomérica resultante de la degradación Enantioselectividad en torno a la unidad	Estudio de la degradación en sedimentos	326
diclofop-ácido y diclofop-metil	Columna de α ₁ -glicoproteína ácida AGP 100×3 mm	2-propanol/tampón fosfato pH 7 (0.5-9: 99.5-91)	UV (230 nm)	0.03-0.10 mg·L ⁻¹	-	ER obtenidas en torno a la unidad. Estudio realizado mediante cromatografía bidimensional	Formulación comercial SIROFOP®	327

Tabla 14 (Continuación). Determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Herbicidas	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
fluazifop-butyl, quizalofop-etil, mefenpyr-dietil	Columna de α_1 - glicoproteína ácida AGP 100×3 mm	2-propanol/tampón fosfato pH 7 (5-9: 95-91)	UV (230 nm)	0.05-1.56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	74-94 %	ER obtenidas en torno a la unidad y EF en torno a 0.5 para mezclas racémicas	Suelos arcillosos	328
diclofop-ácido y diclofop-metil	Columna de celulosa CHIRALCEL OJ-H 250×4.6 mm	n-hexano/IPA (90:10 v/v)	UV (254 nm)			Estudio de relacion enantiomérica resultante de la degradación Enantioselectividad en torno a la unidad	Estudio de la degradación en arroz	329
diclofop-metil	Columna modificada amilosa-tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) 150×4.6 mm	Hexano/isopropanol (98:2, v/v)	DAD (230 nm)	2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	> 60%	Degradación estereoespecífica de dicho herbicida, utilizando como parámetros de control ER y EF	Estudio de la degradación en coles	144
diclofop y fenoxaprop- etil	nano columna de tert-butilbenzoilato tartardiamida	n-hexano/2- propanol/ácido acético (89:10:1, v/v/v)	DAD (230 nm)	-	-	Estudio de la influencia de la temperatura en la enantioresolución de los herbicidas	-	330
haloxyfop- ethoxietil, fluazifop-butyl	Columna modificada con 2-hydroxipropil- β - ciclodextrina	Acetonitrilo/fosfato sódico 20 mM pH 4.6 (65:35, v/v)	DAD (254 nm)	-	-	Columna no comercial, sintetizada en el laboratorio Enantioselectividad >3	-	331

Tabla 14 (Continuación). Determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Herbicidas	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
quizalofop-etil, quizalofop-ácido	Columna de celulosa Chiralpak AD-H 250×4.6 mm	n-hexano/2- propanol/ácido acético/agua (90:10:0.2:0.06, v/v/v/v)	UV -	-	-	Degradación enantioselectiva. Enantioselectividad > 1	Algas	146
quizalofop-etil y otros herbicidas de distintas familias	Columna de celulosa Chiralpak OD-H 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol (100:1, v/v)	UV (230 nm)	-	-	Estudio de la racemización producida por la adición de disolventes a la fase móvil	-	332
fenoxaprop-etil, fenoxaprop-ácido	Columna modificada amilosa-tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol/TFA (95:5:0.1, v/v/v)	UV (230 nm)	0.05 µg·g ⁻¹	>90 %	Degradación enantioselectiva con ER comprendidos entre 1 y 0.5	Suelos	333
diclofop-ácido y diclofop-metil	Columna modificada amilosa-tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol/TFA (96:4:0.1, v/v/v)	UV (230 nm)	0.3 µg·g ⁻¹	>92 %	Degradación enantioselectiva con ER comprendidos entre 1 y 0.2	Suelos	334
diclofop-ácido y diclofop-metil	Columna modificada amilosa-tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) 250×4.6 mm	Hexano/isopropanol (90:10, v/v)	CD (220 nm)	0.5 µg·g ⁻¹	84- 102%	Degradación enantioselectiva con EF comprendidos entre 0.5 y 0.44	Col china	143

5.2.1.2.B) DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA QUIRAL DIRECTA

En los últimos años, el número de CSPs disponibles para la separación enantiomérica de aminoácidos se ha incrementado enormemente. Dichas fases estacionarias proporcionan buenas resoluciones enantioméricas lo que permite la determinación de las formas L- y D- de los enantiómeros en distinta proporción. Aún así, muchos autores se inclinan todavía por el uso de aditivos quirales a la fase móvil utilizando columnas convencionales de ODS (335).

Giuffrida y col (166), para el análisis de D-aminoácidos en levaduras modificadas genéticamente, utilizaron como aditivo quiral de la fase móvil una β -CD nativa en concentración de 10 mM, pudiendo determinar concentraciones de algunos aminoácidos como D-Arg de hasta 40 nM. Recientemente, Xiao y col (336) han empleado también dicho selector quiral como CMPA en la separación enantiomérica de dansil aminoácidos mediante UPLC obteniendo resoluciones a línea base de todos los analitos estudiados en menos de 10 min de análisis.

No sólo se han utilizado las ciclodextrinas como aditivo quiral de la fase móvil; basándose en el mecanismo de las CSP de intercambio de ligandos, Dimitrova y col. (337) emplearon como CMPA el complejo de la N, N-dimetil-L-fenilalanina con Cu (II) para la separación quiral de Val, Leu, Tyr y Met obteniendo valores de α de hasta 2.49 para la Tyr.

Sin duda, los ejemplos más numerosos recogidos en bibliografía corresponden al uso de CSPs basadas en antibióticos macrocíclicos, mostrando excelentes resultados en la determinación de D-aminoácidos en un e.e del 99% en matrices biológicas complejas. En estas separaciones se han empleado fases móviles mezcla metanol/agua o medio tamponado y en algunos casos cuando el selector quiral utilizado era la ristocetina, las mejores enantioseparaciones se han conseguido empleando el llamado modo orgánico polar (POM) con fases móviles metanólicas modificadas con un pequeño porcentaje de TEA y un ácido, ya sea fórmico o acético.

La teicoplanina ha mostrado excelentes resultados especialmente en la separación enantiomérica de los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp dónde la enantioresolución obtenida ha sido muy superior a la unidad. Haroun y col. (338) demostraron que el orden de elución de los enantiómeros de este tipo de aminoácidos

se podía invertir fácilmente cuando se daban cambios drásticos en la orientación o conformación de dicho selector quiral debido a la integración del resto hidrofóbico de la teicoplanina en el soporte alquílico sobre el que se enlaza dicho selector quiral.

En la mayoría de los casos, las CSP's de antibióticos macrocíclicos utilizadas se comercializan bajo el nombre CHIROBIOTIC T, V ó R según sean de teicoplanina, vancomicina o ristocetina respectivamente. Muchos autores han optado por el empaquetamiento de la fase estacionaria en el propio laboratorio. En el grupo del profesor Fanali (340), empaquetaron una nano columna de vancomicina que aplicaron con éxito en la detección de D-aminoácidos en zumos de naranjas que habían sufrido un proceso de adulteración y Song y col (339) llevaron a cabo el empaquetamiento de columnas capilares de teicoplanina, aplicándolas junto con la espectrometría de masas a la determinación de los D-enantiómeros de 12 aminoácidos en muestras de fluido cerebroespinal. No sólo se han aplicado los tres antibióticos descritos anteriormente, Staroverov y col. y Ding y col. (345,346) empaquetaron fases estacionarias de norvancomicina y eremomicina respectivamente para la separación de enantiómeros de aminoácidos proporcionando valores de enantioresolución en algunos casos menores de la unidad.

Otras fases estacionarias utilizadas son la de intercambio de ligando. Los derivados de R-cisteína se han utilizado en cromatografía de líquidos con fases móviles basadas en sales de Cu (II), y algunos derivados de la L-valina en cromatografía de gases. Dichas CSP's exigen unas condiciones de operación mucho más restringidas que los antibióticos macrocíclicos y en el caso de las empleadas en cromatografía de líquidos, requieren una exhaustiva optimización tanto del tipo de sal de Cu (II) utilizada como de la concentración de la misma. Fases similares a éstas son las "Brush Type", que para aminoácidos se suelen basar en L-tartárico operando bajo condiciones de fase normal.

Una alternativa que se estudia en la actualidad es el uso de polímeros de impresión molecular, que en el caso de aminoácidos se han empleado como plantilla el Boc-L-Trp o una en β -ciclodextrina enlazada a acrilamida. Estas fases proporcionan excelentes resultados, llegando a ser capaces de determinar excesos enantioméricos de hasta el 90% incluso con fases móviles acuosas, sin embargo, el mayor inconveniente es su alta especificidad, ya que únicamente consiguen separar los enantiómeros de un aminoácido específico, en este caso el Trp.

Con respecto a las fases basadas en ciclodextrinas ó éteres corona los ejemplos recogidos en bibliografía son menos numerosos. En cromatografía de líquidos, se han empleado CSPs comerciales basadas en ciclodextrinas nativas proporcionando enantioselectividades razonables, mientras que en cromatografía de gases el uso de una β -ciclodextrina modificada, ha proporcionado resolución a línea base de un gran número de aminoácidos. En cuanto a los éteres corona, el uso de un (S, S)-dimetilpiridino-18-corona-6 éter, ha permitido la separación directa de Tyr, Phe y Trp con resoluciones en la mayoría de los casos superiores a 2.

En los últimos años el grupo de investigación del profesor W. Lindner de la Universidad de Viena, está contribuyendo de manera notable al desarrollo de nuevas CSP's específicas para el análisis quiral de aminoácidos. Las columnas basadas en quinina tert-butilcarbamato o en el alcaloide Cinchona (360, 361) fueron desarrolladas y patentadas por dicho grupo de investigación y se caracterizan principalmente por la elevada enantioselectividad para los enantiómeros N-protectados de los aminoácidos. La CSP comercializada con el nombre de Chiralpak QN-AX es una fase estacionaria de intercambio aniónico débil diseñada por el grupo del profesor Lindner, específica para la separación quiral de compuestos ácidos que contienen grupos carboxílicos, y que ha mostrado excelentes resultados en la separación enantiomérica de Val, Ile, Leu en matrices biológicas complejas.

Con respecto a las columnas tipo Pirkle, la microcolumna comercial Sumichiral OA-2500S actualmente está mostrando excelentes resultados en la separación quiral de hasta 17 tipos de aminoácidos mediante elución isocrática con fases móviles basadas en metanol/ácido cítrico (363, 364). Este tipo de columnas resultan especialmente indicadas para la determinación de pequeñas cantidades de D-aminoácidos (e.e de hasta un 0.01 %) utilizando los acoplamiento bidimensionales tipo multi-bucle en los que se utilizan columnas de tipo microbore y una unidad compuesta de varios bucles utilizados para retener, concentrar y transferir selectivamente los picos de interés a la columna quiral.

La detección UV (205-280 nm) y la FLD siguen siendo las técnicas más comunes de detección dando excelentes resultados incluso en matrices complejas como alimentos o muestras biológicas. En la tabla 15 se recogen los ejemplos más representativos recogidos en bibliografía sobre determinación quiral de aminoácidos mediante cromatografía quiral directa.

Tabla 15 .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D-Tyr, Phe y Trp	Columna de teicoplanina Chirobiotic T (150 x 2.1 mm)	Metanol/agua (90:10, v/v)	UV (260 nm)	0.8-3 mg·L ⁻¹	79-96 %	Estudio realizando mediante cromatografía bidimensional. Enantioselectividad >1	Alimentos RTE sometidos a radiaciones ionizantes	112
Enantiómeros L-y D-Tyr, Trp, 5-OHTP, y derivados metilados del Trp y Tyr.	Columna C ₁₈ modificada con teicoplanina (250 x 4 mm)	Tampón fosfato 5 mM pH 7	UV (260 nm)	-	-	Columna sintetizada en el laboratorio. Resoluciones y enantioselectividad >1	-	338
Enantiómeros L-y D-Asp, Glu, Ser, Trp, Tyr, Phe, Arg, Ile, Leu, met, Lys, Thr	Columna capilar empaquetada con teicoplanina (100 x 0.25 mm)	Metanol/agua (80:20, v/v)	ESI-MS/MS (modo SRM)	-	-	Preconcentración en una columna C 18 mediante derivatización con DNB-F. Resoluciones próximas a la unidad	Fluido cerebroespinal	339
Enantiómeros L-y D-Arg, Ala, Pro, Leu, Ser, Phe, Asn, Glu, Asp	Columna nano empaquetada con vancomicina	Formiato amónico 500 mM pH 3.5/agua/metanol (4:11:85, v/v/v)	UV-ESI-MS (Modo SIM)	8 ng·L ⁻¹	-	Preconcentración en una columna C 18 mediante derivatización con FITC. Resoluciones comprendidas entre 0.2-1.49	Zumo de naranja	340
Enantiómeros L-y D-Ser, Thr	Columna de teicoplanina Chirobiotic T (150 x 4.6 mm)	2-propanol/agua (80:20,v/v)	UV (230 nm)	-	-	Estudio de varios disolventes orgánicos en la fase móvil	-	341

Tabla 15 (Continuación) .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D Ser, Glu, Asp	Columnas capilares de vancomicina, teicoplanina, teicoplanina aglicona (170 x 0.25 mm)	Metanol/agua/TFA (60:40:0.012, v/v/v)	ESI-MS/MS (modo SRM)	-	-	Preconcentración en una columna C 18 mediante derivatización con NBD-F Determinación de e.e de hasta el 99% respecto al enantiómero L-	Cerebro	342
Enantiómeros L-y D Ala, Asn, Leu, Ile, Arg	Columna capilar empaquetada con ristocetina (100 x 1 mm)	Metanol/TEA 0.01% (POM) Metanol/agua (50:50, v/v)	UV (208 nm)	-	-	Derivatización con FMOC. Resolución a línea base de todos los anallitos	-	343
Enantiómeros L-y D de 28 aminoácidos sintéticos	Columna de ristocetina A Chirobiotic R (250 x 4.6 mm)	Metanol/agua (20:80, v/v) Metanol/TEA/ácido acético (POM) (100:0.1:0.1, v/v/v)	UV (205 nm)	-	-	Resoluciones comprendidas entre 0.4 y 4.3	-	344
Enantiómeros L-y D de Ala, Val, Met, Pro, Phe, Leu, Ser, Thr, Tyr, Trp	Columna en base sílice modificada con eremomicina (150 x 4 mm)	Metanol/agua (50:50 v/v)	UV (220-280 nm)	-	-	Mejora de la enantioresolución obtenida con ristocetina y vancomicina. Resoluciones comprendidas entre 0.4-7	-	345
Enantiómeros L-y D Met, Thr, Glu y GABA	Columna en base sílice modificada con norvancomicina (200 x 4.6 mm)	Metanol/nitrato amónico 20 mM (35:65, v/v)	UV (254 nm)	-	-	Determinación de los dansil derivados Resoluciones en torno a la unidad o menores	-	346

Tabla 15 (Continuación) .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D Leu, Asp, Glu, Ser, Thr, Gly, Ala, Pro, Val, Met, Tyr, Leu, Ile, His, Arg	Columna de teicoplanina Chirobiotic T (250 x 4.6 mm)	Acetonitrilo/agua (75:25 v/v) + Ácido fórmico 500 mM	ISP-MS/MS (Modo SRM)	2.5-50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-	Análisis simultáneo de todos los aminoácidos con resolución superior a la unidad	-	347
Enantiómeros L-y D Tyr, Phe, Trp y Arg	Columna de teicoplanina Chirobiotic T (250 x 4.6 mm)	Acetonitrilo/TEA 1% pH 4.1	UV (254 nm)	-	-	Separación de los N- tert-butoxi derivados. Resoluciones obtenidas superiores a la unidad	-	348
Enantiómeros L-y D Val, Ser, Leu, Phe	Columna de teicoplanina Chirobiotic T (250 x 4.6 mm)	Metanol/tampón citrato 0.05 M (15:85, v/v)	UV (254 nm)	-	-	Determinación de los dansil derivados. Estudio de las variables que afectan a la enantioresolución	-	349
Enantiómeros L-y D Ile, Leu, Val, His, Phe, Tyr	Columna de intercambio de ligandos basada en S-tritil-(R)-cisteína	Nitrato de Cu (II) 1mM	UV (254 nm)	-	-	Estudio de la enantioresolución en función del contraión de la sal de Cu (II).Mayores enantioresoluciones con nitrato Cu (II)	-	350
Enantiómeros L-y D- Glu, His, Ile, Leu, Cys, Arg, Asn, Asp	Columna de intercambio de ligandos basada en S-benzil-(R)-cisteína	Sulfato de Cu (II) 1mM	UV (254 nm)	-	-	Comparación de resultados con otras columnas basadas en:S-difenilmetil-(R)- cisteína y S-tritil- (R)-cisteína	-	351

Tabla 15 (Continuación) .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D-Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Tyr, Val	Columna de intercambio de ligandos basada en el dinaftil derivado de neamina	Sulfato de Cu (II) 1mM	UV (236 nm)	-	-	Resoluciones enantioméricas comprendidas entre 0-2.45	-	352
Enantiómeros L-y D-Ala, Asn, Asp, Glu, Gln, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	Columna de intercambio de ligandos basada en la sal monosódica del (R)-N,N-carboximetil undecil fenilglicinol	Sulfato de Cu (II) 0.3 mM	UV (254 nm)	-	-	Estudio de la influencia de la concentración de Cu (II) en la enantioresolución comprendida entre 1.23-4.84	-	337
Derivados sintéticos de aminoácidos naturales	Columna Brush Type de red polimérica basada en ácido L-tartárico (150 x 4.6 mm)	hexano/2-propanol (95:5, v/v)	UV (254 nm)	-	-	Estudio de la influencia de la composición de la fase móvil en la enantioselectividad comprendida entre 1.27-1.49	-	353
Enantiómeros L-y D-Boc-Trp	Polímero de impresión molecular basado en Boc-L-Trp (100 x 4.6 mm)	Acetonitrilo/ácido fosfórico 20 mM pH 3.2 (30:70, v/v)	UV (220 nm)	-	-	Enantioresoluciones superiores a la unidad con distintos MIPs sintetizados	-	354
Enantiómeros L-y D-Trp	Polímero de impresión molecular basado en β -ciclodextrina enlazada a acrilamida	Tampón PBS 0.01 M pH 6.2	UV (278 nm)	-	-	Enantioresoluciones comprendidas entre 0.91-2.18. Capacidad de detección de e.e de hasta el 90%	-	355

Tabla 15 (Continuación) .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D-Ala, Leu	Columna de β - y γ -ciclodextrinas nativas Cyclobond II (250 x 4.6 mm)	Metanol/TEA/ácido fórmico (100:1.2:0.3, v/v/v)	UV (265 nm)	-	-	Separación de los Fmoc derivados Enantioselectividad comprendida entre 1-1.22	-	356
Enantiómeros L-y D-Ala, Val, Ile, leu, Asp, Gln, Phe, Glu, Pro, Thr, Ser, Cys, Met, Tyr, Lys, Trp	Columna Lipodex G a base de octakis(6-O-metil-2,3-di-O-pentil)- γ -ciclodextrina y Heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-tertbutyldimetilsilil)- β -ciclodextrina (50m×0.25mm)	H ₂	FID			Separación de los N-(O,S)-trifluoroacetil derivados. Resolución a línea base de todos los aminoácidos estudiados	-	357
Enantiómeros L-y D-Ala, Val, Thr, Ile, pro, Ser, Leu, Asp, Met, Glu, Phe, Tyr, Lys, Arg, His	Columna Chirasil-L-Val a base de N- <i>tert</i> .-butil-L-valina-polisiloxano (25 m x 0.25 mm)	He	FID	-	-	Detección de D-aminoácidos en proporción de hasta el 0.1 %	Cervezas	155
Enantiómeros L-y D-Ala, Val, Pro, Ile, Leu, Asp, Thr, Asn, Met, Cys, Glu, Gln, Phe, His, Lys, Tyr, Ser, Arg, Trp	Columna Chirasil-L-Val a base de N- <i>tert</i> .-butil-L-valina-polisiloxano (25 m x 0.25 mm)	He	MS (Modo SIM)	0.18-0.98 pmol	-	Separación de los N(O,S)-alkil alkoxi carbonil ésteres. Resoluciones enantioméricas comprendidas entre 0.4-6.24	-	358
Enantiómeros L-y D-Tyr, Phe y Trp	Columna éter corona basada en (S,S)-dimetilpiridino-18-corona-6 eter	Metanol:ácido acético/Metanol:TFA (gradiente)	CD	-	-	Resoluciones comprendidas entre 0.73-2.73	-	359

Tabla 15 (Continuación) .Determinación quiral de aminoácidos en diversas matrices mediante cromatografía de quiral directa

Aminoácidos	Columna	Fase móvil	Detector	LOD	Rec.	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros L-y D- Leu, Ala, Phe	Columna basada en quinina <i>tert.</i> - butilcarbamato	Metanol/acetato amónico 0.02 M pH 6 (80:20, v/v)	UV (230 nm)	-	-	Separación de los <i>N</i> - acetil aminoácidos. Resolución a línea base	-	360
Enantiómeros L-y D- Tyr, Phe, Trp y sus derivados ácidos	Columna quiral zwitterionica basada en el alcaloide <i>Cinchona</i>	Ácido fórmico 50 mM y amoniaco 25 mM en metanol	UV (280 nm)	-	-	Resolución a línea base tanto en modo de intercambio catiónico como aniónico	-	361
Enantiómeros L-y D- Val, Ile, Leu	Columna quiral de intercambio aniónico Chiralpak QN-AX (150 x 4 mm)	Acetonitrilo/ácido cítrico 10 mM en metanol (50:50, v/v)	FLD	~ 1.3 nmol·g ⁻¹	96-100%	Determinación de los NBD-F derivados mediante cromatografía bidimensional Enantioresoluciones entre 2.72-4.29	Tejidos de rata	362
Enantiómeros L-y D- Ser, Ala	Micro columna tipo Pirkle Sumichiral OA-2500S (250 x 1.5 mm)	Acetonitrilo/ácido cítrico 5 mM en metanol (50:50, v/v)	FLD	500 amol	95-103%	Determinación de los NBD-F derivados mediante cromatografía bidimensional Enantioresoluciones superiores a la unidad	Tejidos y fluidos de raton	363
Enantiómeros L-y D- Asp. Glu	Micro columna tipo Pirkle Sumichiral OA-2500S (250 x 1.5 mm)	Acetonitrilo/ácido cítrico 2 mM en metanol (50:50, v/v)	FLD	~ 0.625 nmol·g ⁻¹	-	Determinación de los NBD-F derivados mediante cromatografía bidimensional. Detección de D- aminoácidos en proporción de hasta el 0.01 %	Tejidos y fluidos de raton	364

5.2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN NO CROMATOGRÁFICOS DE DETERMINACIÓN QUIRAL

La electroforesis capilar (CE) es una técnica muy común aplicada a separaciones quirales. Los principios de la separación quiral mediante CE son varios, entre los cuales el más habitual es la formación de complejos "host-guest" o de inclusión, en los cuales el analito (molécula guest, huésped) está espacialmente incluida en el interior de un ligando (molécula host, receptor) denominada selector quiral.

En la bibliografía se recogen numerosas separaciones quirales de un elevado número de compuestos de interés utilizando multitud de selectores, entre los que destacan los éteres corona, las ciclodextrinas (CDs), los antibióticos macrocíclicos y los calixarenos quirales, surfactantes quirales y proteínas. La separación de enantiómeros mediante electroforesis capilar presenta la ventaja de que la cantidad de selector quiral que se requiere es muy pequeña, y de la gran facilidad para realizar cambios en el selector quiral escogido (365-366).

En el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, se han realizado algunas separaciones quirales mediante electroforesis capilar utilizando como detección habitual la absorción UV. Más concretamente, en el caso del diclofop-metil y diclofop-ácido, la separación de sus enantiómeros mediante electroforesis capilar se ha conseguido utilizando como selector quiral las ciclodextrinas (279-281), antibióticos macrocíclicos como la vancomicina (367) o alcaloides (368), con detección UV o detección por fluorescencia de láser inducida. Con respecto al análisis quiral de aminoácidos mediante electroforesis capilar, los ejemplos que se recogen en bibliografía son mucho más amplios que en caso de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. Los selectores quirales utilizados son muy variados; se han aplicado complejos de ácido D-glucónico con Cu (II) (369), ciclodextrinas (370), antibióticos macrocíclicos como la teicoplanina o vancomicina (371) ó éteres corona (372). El acoplamiento de la electroforesis capilar con la espectrometría de masas, ha permitido la determinación de D-aminoácidos en alimentos llegando a e.e de hasta el 98 % (164).

5.3. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS MULTIDIMENSIONALES

El principal problema del análisis cromatográfico surge cuando, debido a la complejidad de la muestra, es difícil conseguir una separación satisfactoria de los analitos o se hace necesaria una limpieza exhaustiva de la muestra con pretratamientos como la precipitación, extracción en fase sólida, secado, filtración, etc. que en muchos casos resultan muy laboriosos y no del todo eficaces dando lugar a un incremento considerable del tiempo de análisis y a pérdidas de analito.

Es por este motivo por el que en la década de los 90 se comienzan a utilizar las **técnicas de separación multidimensionales** muy indicadas para la determinación de uno o más analitos específicos en matrices de alta complejidad. En este tipo de acoplamientos se hace uso de dos o más sistemas cromatográficos para conseguir separaciones difíciles de alcanzar mediante un único sistema. La muestra inicialmente es sometida a una primera separación cromatográfica de tal manera que los componentes ya separados, se someten a otra separación adicional, aumentando la eficiencia, selectividad, capacidad de pico y sensibilidad en la determinación del analito de interés (373). Los acoplamientos utilizados en el análisis medioambiental y alimentario habitualmente implican cromatografía de líquidos (MDLC), de gases (MDGC) o la combinación de ambas dos (LC-GC), existiendo diversas modalidades en función del modo en que se lleve la separación:

Las primeras separaciones bidimensionales se basaban en que la separación de los analitos tenía lugar en un sistema bidimensional de superficies planas como por ejemplo un gel o una capa fina. Así por ejemplo, la **cromatografía bidimensional en capa fina** (2D-TLC), ha sido aplicada satisfactoriamente en el análisis de metabolitos secundarios de medicamentos derivados de plantas medicinales, resultando una alternativa de análisis fácil y de gran rapidez en el campo de la fotoquímica (374).

Dentro de las separaciones bidimensionales en tiempo, las separaciones bidimensionales **discontinuas** (**"off line"**) son aquellas en las que las fracciones eluidas de la primera dimensión se recogen manualmente o mediante un colector de fracciones y se inyectan, con o sin preconcentración, en la segunda dimensión. Este modo de operación resulta bastante simple, no necesita de válvula de desplazamiento, y el proceso de optimización resulta muy sencillo, por lo que muchas veces se utiliza como método de limpieza de muestra, aunque suele resultar un

análisis excesivamente lento. Esta metodología se ha aplicado recientemente y con resultados satisfactorios en el análisis de flavonoides permetilados en hierbas medicinales (375). Las separaciones bidimensionales **continuas** (“on line”) emplean válvulas de desplazamiento u otro dispositivos que permite transferir directamente a la segunda dimensión las fracciones separadas en la primera, resultando un análisis mucho más rápido que en el modo discontinuo, ya que al mismo tiempo que se produce la separación en la primera dimensión, va teniendo lugar la separación en la segunda dimensión. La principal limitación de esta metodología, sobre todo en el caso de la cromatografía de líquidos, es la compatibilidad de fases, tanto en miscibilidad como en la fuerza eluyente del disolvente. Esto hace que no todos los tipos de columna sean compatibles, y lo que es más, el uso de dos principios diferentes de separación puede dar una inversión en el orden de elución en las dos columnas consecutivas o incluso la separación conseguida en la primera columna, puede reducirse substancialmente en la segunda columna, por tanto los procesos de optimización resultan más complejos (373, 376-379). Además de la mejora de la sensibilidad y selectividad, este tipo de acomplamientos permiten integrar el sistema de preparación de muestra, separación y detección, en un único sistema cromatográfico, ofreciendo un alto grado de automatización del proceso analítico global. En la figura 13 se muestra el esquema básico de un sistema cromatográfico multidimensional formado por dos columnas analíticas acopladas.

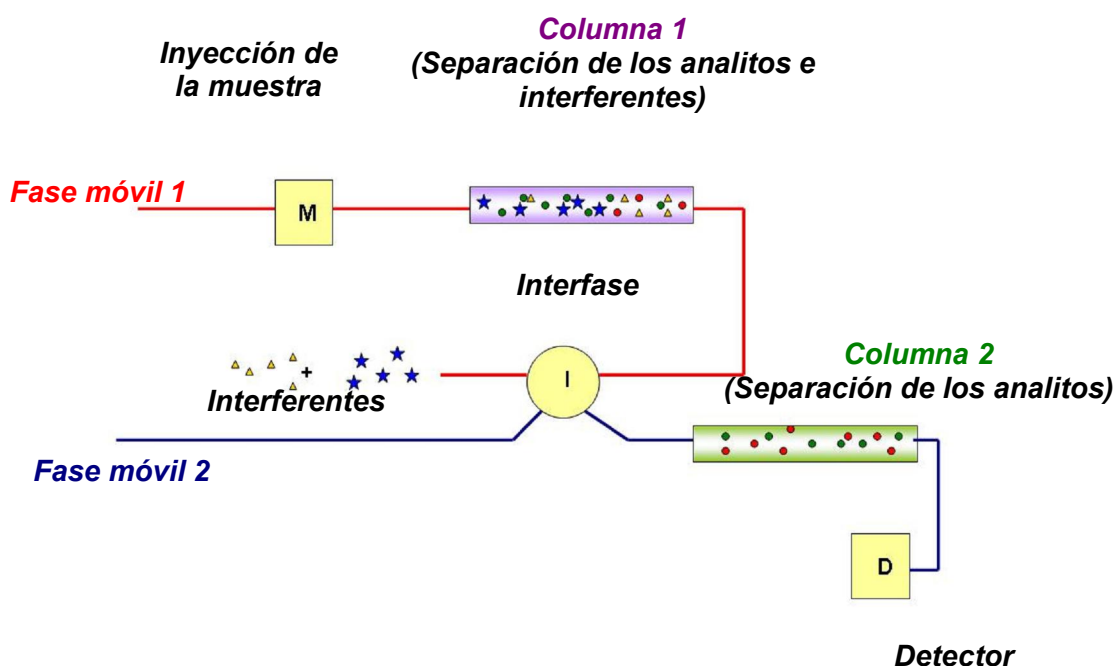


Figura 13. Representación esquemática general de un sistema cromatográfico acoplado.

Cuando se lleva a cabo un análisis cromatográfico mediante un acoplamiento bidimensional, la transferencia entre el primer y el segundo sistema cromatográfico se puede llevar a cabo de distintos modos: se pueden transferir cada una de los picos que se eluyen del primer sistema, transferir únicamente un grupo de picos, o simplemente transferir la fracción de interés de un pico. Por tanto, según sea la transferencia se pueden diferenciar entre **acoplamientos cromatográficos totales** o de conjunto (“comprehensive” LCxLC, GCxGC), o de **corte** (“cut” LC-LC, GC-GC) (380). En el primer caso, cada uno de los componentes de una muestra es sometido a dos separaciones consecutivas mediante el acoplamiento en serie de dos columnas cromatográficas, es decir, todos los componentes separados en la primera dimensión, vuelven a separarse en la segunda. En el caso de acoplamientos multidimensionales de corte, solo una fracción de la primera columna, un grupo de picos o una fracción específica de un pico cromatográfico, son transferidos a la segunda dimensión (373).

A continuación, se describirán los acoplamientos multidimensionales que implican cromatografía de líquidos puesto que parte del trabajo descrito en esta memoria se basa en la optimización y aplicación de métodos analíticos basados en dichos sistemas.

5.3.1. ACOPLAMIENTOS CROMATOGRÁFICOS LCxLC, LC-LC

Los acoplamientos multidimensionales de cromatografía de líquidos, se basan en la transferencia completa o parcial selectiva de una porción del eluato que contiene los analitos de interés de una columna inicial (C1) a una segunda columna (C2) para su posterior separación. Su principal objetivo consiste en hacer máxima la inyección de la banda de analito en la columna C2 y mínima la de compuestos interferentes, de forma que la muestra se separa parcialmente en la columna C1, y la fracción que contiene los analitos de interés se transfiere a la columna C2 para su separación final (207).

Como ya se ha comentado, esta técnica se puede llevar a cabo en línea, conectando ambas columnas con una **válvula de desplazamiento o válvula “switch”** de alta presión o mecánica, o bien en discontinuo, donde las fracciones eluidas de la primera columna se recogen manualmente o con un colector de fracciones para, a continuación, volver a ser reinyectadas en la segunda columna. Las técnicas en línea

presentan la ventaja de que el proceso puede ser automatizado. De esta manera, es posible la introducción de un mayor número de muestras por unidad de tiempo, disminuyendo los tiempos de análisis, el consumo de disolventes y la manipulación de la muestra. Como contrapartida, requieren válvulas, columnas y bombas adicionales, fases móviles compatibles en términos de miscibilidad y fuerza eluotrópica (373, 376).

- **Modos de operación**

- a) *Acoplamientos LCxLC*

El modo más simple de llevar a cabo separaciones bidimensionales LCxLC, es mediante el acoplamiento en serie de dos columnas cromatográficas o bien con mecanismos de separación parecidos ó con mecanismos de separación ortogonales pero empleando una elución isocrática con la misma fase móvil en ambas dimensiones. Esta metodología, aunque sencilla, es poco frecuente ya que pocas veces una misma fase móvil proporciona separaciones eficaces en dos modos cromatográficos distintos, por lo que el modo más común de trabajar es mediante la elución en gradiente en una o en ambas dimensiones.

El acoplamiento de las dos columnas cromatográficas generalmente se lleva a cabo mediante una válvula de desplazamiento que trabaja a alta presión, la cual atrapa cantidades específicas de la primera dimensión, normalmente en un bucle, y las dirige secuencialmente a la segunda dimensión (373). Estas técnicas, por otra parte ofrecen la posibilidad de automatización de una manera sencilla, gran reproducibilidad, y tiempos cortos de análisis, pero por otra parte, la dificultad de operación es elevada, necesitan de interfases especiales y además el volumen de datos generados hacen que sea necesario el uso de programas informáticos específicos de tratamiento de datos (377, 380-381).

- b) *Acoplamientos LC-LC*

La cromatografía líquida bidimensional de corte (LC-LC) es la metodología más convencional en las separaciones bidimensionales. En ella fracciones de la columna primaria son transferidas selectivamente a la columna secundaria dónde se mejora la separación, por lo que en LC-LC todo el proceso se debe llevar a cabo en continuo. La fracción de interés puede ser del principio del efluente cromatográfico (“*front-cut*”), del medio (“*heart-cut*”), o del final (“*end-cut*”). Las dos columnas se

unen mediante una válvula de desplazamiento, de tal forma que cualquier componente presente en el efluente cromatográfico de la primera columna, puede ir al detector, al desecho, o a la segunda columna (373, 376, 382).

En este tipo de acoplamientos hay que tener en cuenta la ortogonalidad de los sistemas implicados. Los mecanismos de separación en un acoplamiento bidimensional deben ser ortogonales; es decir, que las propiedades químicas o físicas por las que se separa el analito deben ser diferentes en ambas dimensiones (383). Por ejemplo en la primera dimensión se puede utilizar cromatografía líquida en fase inversa, separando los analitos atendiendo a su hidrofobicidad, mientras que en la segunda dimensión se puede utilizar una cromatografía líquida de intercambio iónico que separará a los analitos atendiendo a las interacciones electrostáticas, aunque también se pueden dar acoplamientos no ortogonales como fase reversa-fase reversa y fase normal-fase normal (377, 378), cuyo fin es la mejora de la separación cromatográfica conseguida en la primera dimensión.

Este modo de trabajo requiere una exhaustiva optimización cromatográfica en ambas dimensiones, prestando especial atención a los siguientes factores:

- El poder de separación de las columnas cromatográficas utilizadas. En este caso, cuanto más ortogonales sean los mecanismos de separación de las columnas que intervienen en el acoplamiento, mejores serán los resultados obtenidos.
- La composición de las fases móviles. Las fases móviles que se utilicen en el acoplamiento deben ser totalmente compatibles, es decir no deben generar problemas de miscibilidad ni de formación de sales o cualquier otro precipitado.
- La naturaleza y número de analitos.
- Posibles interferentes de la matriz.

La operación crítica de este proceso es la transferencia de la porción de interés de la columna primaria a la columna secundaria (volumen de transferencia). La selección se lleva a cabo mediante una válvula de cambio basada en el tiempo o de desplazamiento, suponiendo que el tiempo de retención del analito y la anchura de pico son constantes, lo que implica condiciones cromatográficas excelentes y gran reproducibilidad en las medidas. Si el tiempo de retención del analito cambia la anchura de pico puede aumentar, y bajo estas condiciones el analito se moverá fuera del tiempo preseleccionado en la válvula. La determinación del tiempo de

transferencia puede automatizarse mediante repetidos análisis con el analito de interés (112, 327).

La cromatografía líquida bidimensional LC-LC puede utilizarse con varios fines, entre los cuales destaca:

- **Enriquecimiento de trazas o preconcentración y limpieza de la muestra.** Es una de las aplicaciones más importantes y en los últimos años se ha incrementado rápidamente, particularmente en los análisis medioambientales y alimentarias, dónde el analito de interés se encuentra en bajas concentraciones y en matrices muy complejas. Tanto el proceso de enriquecimiento, como el de limpieza, se hace en el mismo análisis cromatográfico, donde la eliminación de los interferentes contribuye por si misma al enriquecimiento del analito de interés.
- **Preconcentración.** Este método es útil cuando se dispone de un gran volumen de muestra y el analito se encuentra en concentraciones bajas, de tal manera que la preconcentración se consigue reteniendo el analito de interés selectivamente en la primera columna, para posteriormente ser eluido a la columna secundaria, consiguiendo además un efecto de limpieza adicional en la muestra.
- **Sistema de separación.** Se aplica cuando se requiere una separación de todos los componentes de una mezcla compleja, de tal modo que los componentes de interés de la columna primaria se fraccionan y se transfieren a la columna secundaria; o bien cuando lo que se requiere es una separación adicional en la columna secundaria de un componente específico de la muestra (373, 376).

Si el acomplamiento bidimensional se utiliza con fines de separación, según las características de los sistemas implicados, el acomplamiento puede ser homomodal o heteromodal. Se denomina acomplamiento **homomodal** a aquel que emplea dos columnas cromatográficas de selectividad análoga, por tanto, lo que se persigue con este tipo de metodologías es mejorar una separación, concentrar o diluir muestra, o acortar tiempos de análisis. Sin embargo, si el acomplamiento es **heteromodal** los mecanismos de separación en ambas dimensiones son diferentes y los cambios de selectividad se deben a cambios en la naturaleza de las fases estacionarias, las cuales normalmente poseen características de separación complementarias. Este tipo de acomplamientos es el más frecuente en los sistemas de separación bidimensional LC-LC (373).

▪ **Instrumentación**

Los acoplamientos LC-LC permiten el uso de equipos comerciales de HPLC, combinando detectores, columnas, válvulas de desplazamiento, etc. sin la necesidad de instrumentos especiales. El sistema más simple consiste en la utilización de una bomba y una válvula de tres o cuatro vías colocada entre la columna C1 y la columna C2. En este tipo de acoplamiento, una posición de la válvula permite el paso de la fase móvil por la columna C1 y el desecho o el detector, y el cambio de posición la transferencia de una a otra columna. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones se utilizan dos bombas y por lo tanto un caudal simultáneo a través de cada columna. De esta forma, se minimizan los pulsos de presión producidos por cambios repentinos de caudal que afectan adversamente a la línea base del detector y se evita la posible pérdida de eficacia de la columna debido a la formación de espacios vacíos (figura 14) (380). Muchos autores optan por un sistema con dos detectores (112, 327), mediante el cual en uno de los detectores se monitoriza la separación de los analitos de los posibles interferentes, para posteriormente transferir la porción de interés a la columna 2, dónde tiene lugar la segunda separación y la consiguiente detección y procesamiento de la señal en el segundo detector. En la figura 15 se muestra el esquema básico de un sistema cromatográfico multidimensional LC-LC formado por dos columnas analíticas acopladas, una válvula de desplazamiento de seis vías, dos bombas y dos detectores.

Las válvulas de desplazamiento utilizadas en este tipo de acoplamientos son variadas. Cuando el acoplamiento es de tipo LC-LC, las válvulas más utilizadas son las de seis vías. Dichos dispositivos, además de ser bastante simples, permiten transferir cuantas veces se requiera las fracciones sin resolver de la primera dimensión a la segunda (figura 15). Las válvulas de desplazamiento de ocho vías unidas a bucles de muestra son el dispositivo más sencillo cuando se requiere un muestreo repetitivo de la primera dimensión para transferir la totalidad del eluyente cromatográfico. Otra posibilidad es la utilización de válvulas de diez o doce vías, las cuales son las más adecuadas para muestreos periódicos y repetitivos desde la primera a la segunda dimensión. La ventaja de estos dispositivos es que pueden acoplarse a dos columnas en la segunda dimensión manteniendo el caudal prácticamente constante. Sin embargo esta configuración requiere de bucles de muestra para la unión de las posiciones que no intervengan en el acoplamiento (376).

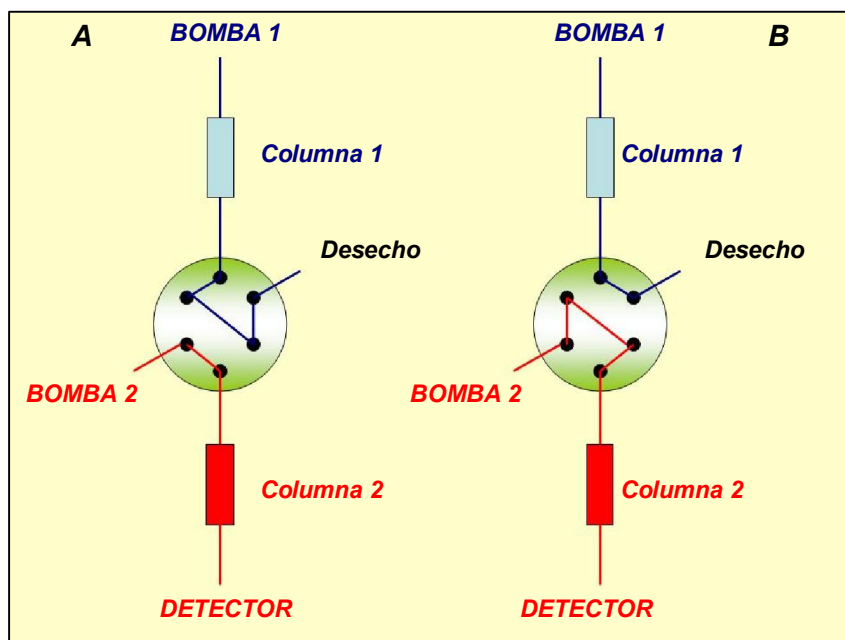


Figura 14. Representación esquemática de un sistema LC-LC con una válvula de desplazamiento de 6 vías. En la posición A, la válvula se llena con la muestra que proviene de la columna 1 y la columna 2 se equilibra con la correspondiente fase móvil. En la posición B, el bucle inyecta la muestra a la columna 2 donde la separación tiene lugar con la consiguiente detección.

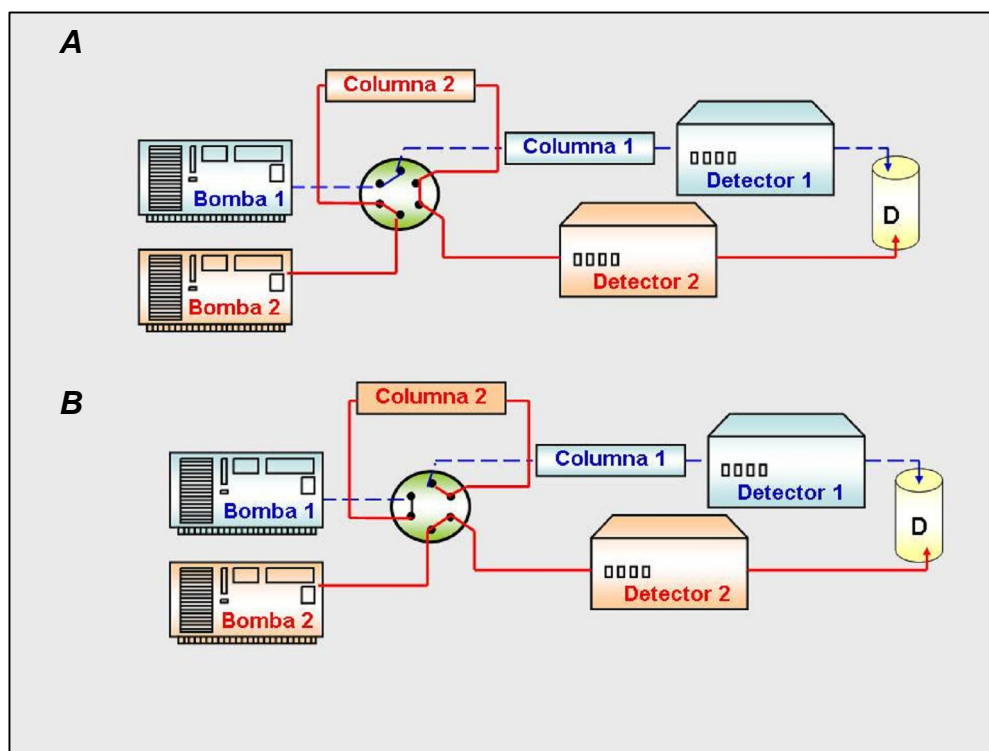


Figura 15. Representación esquemática de un sistema LC-LC con dos detectores sin empleo de bucle.

- **Optimización y análisis**

El análisis mediante este tipo de acoplamientos requiere una exhaustiva optimización no solamente de las fases móviles utilizadas, si no de varios parámetros que aseguren un análisis óptimo en ambas dimensiones:

- Cuando el **caudal** de fase móvil en ambas columnas es el mismo el acoplamiento es sencillo de realizar. Los caudales empleados en ambas dimensiones deben ser lo más parecido posibles para evitar problemas de sobrepresión en el momento de la transferencia (384).
- El **tiempo de transferencia** desde la columna primaria a la columna secundaria es el factor más importante a tener en cuenta en los acoplamientos cromatográficos bidimensionales ya que controla la cantidad de analito transferido. Dicho tiempo debe permitir la llegada de los analitos a la segunda columna, evitando a la vez el paso de cualquier interferente (112, 327).
- El **diámetro interno** de las columnas implicadas debe ser similar para minimizar el ensanchamiento de banda extracolumna (384).
- La **fuerza eluotrópica** de la fase móvil 1 utilizada en la etapa de purificación se debe escoger mediante el compromiso entre una fuerza eluotrópica baja, que aunque permite la inyección de volúmenes mayores de muestras acuosas sin producir un ensanchamiento de banda apreciable, restringe la eliminación eficaz de los interferentes menos retenidos, y una fuerza eluotrópica elevada, que mejora la resolución entre los interferentes y la fracción de analitos de interés y disminuye el tiempo de purificación.

Puesto que parte del trabajo descrito en la memoria se basa en la optimización de acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral, a continuación se realizará una breve discusión sobre los ejemplos más relevantes recogidos en bibliografía sobre dichos acoplamientos.

5.3.2. ACOPLAMIENTOS CROMATOGRÁFICOS BIDIMENSIONALES DE TIPO AQUIRAL-QUIRAL

Tal y como se ha comentado anteriormente la utilización de los acoplamientos bidimensionales con fines de separación requiere de la implicación de diferentes mecanismos de separación.

En este sentido, el acoplamiento LC-LC puede ser empleado como técnica de separación quiral, utilizando una cromatografía secuencial aquiral y otra quiral. El orden de las columnas puede cambiar dependiendo del problema a resolver y de las principales restricciones involucradas, como la baja cantidad de muestra, la baja concentración del analito o el grado de impurezas que pueden estar presentes en la muestra a separar.

Este tipo de acoplamientos resultan especialmente ventajosos, ya que permiten un análisis simultáneo de mezclas racémicas o de distinta proporción de enantiómeros y de los enantiómeros que componen dichas mezclas. En el caso de la cromatografía de líquidos las fases estacionarias quirales anteriormente comentadas, son altamente específicas para la resolución de enantiómeros, pero poco selectivas en el caso de la separación de otros compuestos, por lo que mediante el acoplamiento LC-LC aquiral-quiral, en una primera dimensión se pueden separar los analitos quirales de los demás componentes de la muestra, que seguidamente pueden ser transferidos a la columna quiral, dónde los enantiómeros que formaban el racemato son separados. Por otra parte, las CSPs disponibles comercialmente únicamente trabajan en condiciones muy restringidas, lo cual exige muestras limpias y puras para preservar su integridad, especialmente cuando es preciso analizar un elevado número de ellas (373, 376).

En el caso de análisis medioambientales, los acoplamientos tipo aquiral-quiral son considerados como una opción de gran alcance para mejorar las separaciones quirales de analitos como herbicidas, insecticidas o fungicidas. Habitualmente dichos analitos se encuentran presentes en matrices complejas como suelos, fangos, aguas, etc. que contienen múltiples componentes que pueden interferir o coeluir con los enantiómeros del analito estudiado. La utilización de acoplamientos LC-LC permite la determinación enantiomérica de agroquímicos sin ningún tipo de interferente y por lo tanto la realización de estudios de degradación ambiental mediante cálculos precisos y exactos de relaciones y fracciones enantioméricas (327, 380-382, 384-390).

En el caso de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, los enantiómeros del diclofop-metil y del diclofop-ácido han sido determinados satisfactoriamente en un preparado herbicida de uso habitual mediante un acoplamiento LC aquiral-LC quiral (327) utilizando como CSP una glicoproteína ácida. En este caso, y debido a la gran diferencia en composición en las fases móviles entre ambas dimensiones, se prestó especial atención a la optimización del tiempo de transferencia, tomando como tiempo óptimo aquel que proporcionaba una sensibilidad máxima y por tanto máxima área de

pico de todos los enantiómeros. Una sistemática similar fue utilizada por Mancini y col (389) y Cass y col (390) en la determinación de los enantiómeros del piretroide alletrin y del Gossipol respetivamente, con la diferencia que en estos dos ejemplos, las fases móviles empleadas tanto en la primera como en la segunda dimensión tienen una composición casi idéntica pudiendo determinar en el caso del alletrin tanto los isómeros óptimos como los posicionales de dicho insecticida.

En este tipo de acoplamientos si no se utiliza algún tipo de sistema de focalización o bucles, pueden conllevar una pérdida de sensibilidad causada por la transferencia de únicamente una porción de pico y debido al efecto de dilución inherente a la transferencia de grandes volúmenes. En estos casos es cuando puede ser necesario utilizar una técnica de preconcentración. Hutta y col (388) acoplaron al sistema cromatográfico bidimensional una precolumna para llevar a cabo la preconcentración en línea del fungicida epoxiconazol llegando a unos límites de detección en suelo de los enantiómeros de dicho analito de aproximadamente $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con detección UV en ambas dimensiones. Sin embargo cuando se utiliza como sistema de detección la espectrometría de masas, se pueden llegar a límites de detección en suelos del mismo orden sin necesidad de un sistema de preconcentración (387).

En el análisis de aminoácidos al igual que en el caso de pesticidas quirales, los acoplamientos bidimensionales de tipo aquiral-quiral son una potente herramienta para la determinación de excesos enantioméricos. Como se ha comentado en otros apartados de la memoria, la proporción del enantiómeros D- de los aminoácidos es mucho menor que la del enantiómero L-, por lo que su determinación puede verse interferida fácilmente por numerosos componentes de la matriz. El acoplamiento de una columna aquiral con una CSP, permite la transferencia única del pico cromatográfico correspondiente al aminoácido a la fase quiral, determinando así de forma precisa y exacta y sin problemas de interferencias la cantidad de D-aminoácido presente en la muestra (391). En bibliografía se recogen numerosos ejemplos de determinación de D-aminoácidos en diversas matrices mediante este tipo de acoplamientos (72, 112, 148, 382, 384, 392-397).

En los últimos años el grupo de investigación del profesor W. Lindner de la Universidad de Viena, está contribuyendo de manera notable al desarrollo de acoplamientos LC-LC para la determinación de D-aminoácidos en diversas matrices biológicas (148, 392-393,397). El acoplamiento desarrollado por su grupo, consta de

una columna de diámetro interno reducido en la primera dimensión y una CSP tipo Pirkle o derivada de tert-butil quinidina carbamato en la segunda dimensión, lo que permite la inyección de pequeños volúmenes de muestra en la segunda dimensión evitando así la pérdida de resolución o la deformación de los picos, incrementando al mismo tiempo tanto la velocidad de análisis como el tiempo de reequilibrado del sistema.

Este sistema a veces se complementa con determinadas columnas denominadas “dummy” o columnas ficticias cuya función es la inducir resistencias al flujo y proteger así a las columnas del sistema de caídas de presión repentinas en el momento en que se está llevando a cabo la transferencia (392) o con sistemas multibucle encargado de atrapar, retener y transferir las fracciones de interés a la segunda dimensión (148, 364, 393). Puesto que en muchos casos, la diferencia de fases móviles entre ambas dimensiones puede provocar una pérdida o modificación de la enantioresolución se presta especial atención a la fracción óptima de transferencia que evite dicho efecto (364).

La alternativa más sencilla a estos dispositivos es la utilización de válvulas de desplazamiento de 6 vías sin necesidad del empleo de bucles internos o cualquier otro tipo de sistema de atrapamiento de fracciones. De este modo, se han determinado con éxito los enantiómeros de los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe, Trp en alimentos tratados con radiaciones ionizantes (112), del Asp y Glu en soja (72) y del Asp y Phe en Coca-Cola Zero® (396) a niveles de detección de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ o de la Pro e hidrox-Pro en suero de ratón a niveles de fmol (397). En el caso de la determinación de los aminoácidos aromáticos, también se prestó especial atención en la optimización del tiempo óptimo de transferencia, seleccionando como tal aquel que proporcionaba máximo valor de ER (112). Los dispositivos utilizados pueden conllevar el uso de un solo detector en la segunda dimensión (387) o de un detector en cada dimensión. Aunque generalmente, ambas dimensiones presentan el mismo modo de detección, es posible combinar distintos detectores como UV-CD (389).

En la tabla 16 se recogen los ejemplos más representativos de acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral para el análisis de pesticidas, aminoácidos en diversas matrices.

Tabla 16. Determinación quiral de distintos analitos en diversas matrices mediante acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral

Analitos	Tipo de acoplamiento	1º Dimensión	2º Dimensión	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros de los herbicidas diclofop-metil y diclofop-ácido	“heart cut” LC-LC	Columna C ₁₈ -Luna (150 x 4.6 mm) Metanol/tampón fosfato pH 7 30 mM (73:27, v/v) UV (230 nm)	Columna quiral Chiral-AGP (150 x 3 mm) 2-propanol/tampón fosfato pH7 (gradiente en un solo paso) UV (230 nm)	LD = 1.25-2.70 mg·L ⁻¹ Optimización del tiempo de transferencia mediante el estudio de las áreas de los enantiómeros	Preparado comercial SIROFOP®	327
Enantiómeros de los insecticidas cyfluthrin, propiconazol, triadimenol y fenvalerato	“heart cut” LC-LC	Columna C ₁₈ LiChrosorb (250 x 4.6 mm) -	Columnas quirales Chiralcel OD-H (150 x 4.6 mm) Sumichiral OA-4600 (250 x 4.6 mm) n-hexano/IPA (93:3, v/v) ESI-MS	LD ~ 0.1 ppm para cada enantiómeros Enantioresoluciones por encima de la unidad en todos los casos	Suelos	387
Enantiómeros del fungicida epoxiconazol	“heart cut” LC-LC	Columna C ₁₈ Purospher (250 x 4.6 mm) Metanol/tampón fosfato 20 mM pH 2.5 (gradiente) DAD (254 nm)	Columna quiral de MCTA (150 x 3 mm) Metanol/agua (87:13, v/v) UV (230 nm)	LD ~ 0.01 mg·L ⁻¹ para cada enantiómeros En el análisis de muestras reales, se hace necesaria una preconcentración en columna.	Suelos	388
Enantiómeros del piretroide alletrin	“heart cut” LC-LC	Columna monolítica Chromolith (100 x 4.6 mm) n-hexano/MTBE (96:4, v/v) UV (230 nm)	Columna quiral OJ Daicel (250 x 4.6 mm) n-hexano/MTBE (90:10, v/v) en trans (99:3:0.7, v/v/v) en cis CD (230 nm)	En la columna aquiral separación de los diastereoisómeros cis/trans. Columna quiral separación de los 4 enantiómeros correspondientes	Preparado comercial	389

Tabla 16 (Continuación). Determinación quiral de distintos analitos en diversas matrices mediante acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral

Analitos	Tipo de acoplamiento	1º Dimensión	2º Dimensión	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros del Gossipol	"heart cut" LC-LC	Columna C ₁₈ Hypersil (150 x 4.6 mm) Acetonitrilo/tampón fosfato 10 mM pH 3 (65:35, v/v) UV (254 nm)	Columna quiral empaquetada con tris(3,5- dimetilfenilcarbamato) (150 x 4.6 mm) Acetonitrilo/tampón fosfato 10 mM pH 3 (60:40, v/v) DAD (254 nm)	Estudio de la relación y fracción enantiomérica en la que se encuentra presente el Gossipol en la planta	Raices y flores de <i>G. barbadense</i>	390
Enantiómeros de los aminoácidos aromáticos Tyr, Phe y Trp	"heart cut" LC-LC	Columna C ₁₈ ATLANTIS (150 x 4.6 mm) Metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94, v/v) UV (260nm)	Columna quiral Chirobiotic-T (150 x 2.1 mm) Metanol/agua (90:10, v/v) UV (260nm)	LD = 0.3-3 mg·L ⁻¹ Optimización del tiempo de transferencia mediante el estudio de la variación del valor de ER	Alimentos RTE sometidos a radiaciones ionizantes	112
Enantiómeros de los aminoácidos Asp y Glu	"heart cut" LC-LC	Columna de intercambio iónico de resina BTC 2710 (385 x 3.2 mm) Ácido perclórico pH 1.5 UV (570 nm) Derivatización con ninhidrina	Columna quiral CrownpakCR (+) (150 x 4 mm) Metanol/ácido perclórico pH1 (10:90, v/v) UV (570 nm) Derivatización con ninhidrina	Enantioresoluciones superiores a la unidad. Presencia del D-Asp y D- Glu en muestras de hasta un 5 %	Productos de soja	72
Enantiómeros de los derivados DNB de la Leu, Ile, Val, Phe	"heart cut" LC-LC	Columna microboro C ₁₈ (150 x 1 mm) Acetonitrilo/acetato amónico 50 mM pH 5.5 (25:75, v/v) UV (254 nm)	Columna quiral basada en tert-butil quinidina carbamato (330 x 4.6 mm) Acetonitrilo/acetato amónico 50 mM pH 4.5 (30:70, v/v) UV (254 nm)	Optimización de la fracción óptima de transferencia mediante el estudio de la variación del valor de ER. Utilización de un sistema de bucle interno	-	392

Tabla 16 (Continuación) .Determinación quiral de distintos analitos en diversas matrices mediante acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral

Analitos	Tipo de acoplamiento	1º Dimensión	2º Dimensión	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros de los derivados NBD de His, Asn, Ser, Gln, Arg, Asp, allo-Thr, Glu, Thr	"heart cut" LC-LC	Columna microbore monolítica ODS (1000 x 0.53 mm) Acetonitrilo/agua con TFA 0.06% (6:94, v/v) FLD	Columna quiral microbore Sumichiral OA-2500S (250 x 1.5 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 2.5 mM en metanol (75:25, v/v) FLD	LD < 0.6 nmol·g ⁻¹ Utilización de un sistema de multi bucles para la colecta de fracciones de la primera dimensión	Plasma de rata	393
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Ala	"heart cut" LC-LC	Columna capilar Mightysil RP-18GP (100 x 1 mm) THF/TFA/ACN/agua (1:0.02:10:89, v/v/v/v) FLD	Columna quiral Sumichiral OA-2500S (250 x 4.6 mm) Ácido cítrico 5mM en metanol FLD	LD D-Ala = 5 fmol Utilización de un sistema de bucle interno	Diferentes tejidos de ratón	394
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Val, allo-Ile, Ile y Leu	"heart cut" LC-LC	Columna Capcell pak C ₁₈ (150 x 1 mm) THF/TFA/agua (25:0.05:75, v/v/v) FLD	Columna quiral Chiralpak QN-AX (150 x 4.0 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 5 mM en metanol (50:50, v/v) FLD	LD < 0.15 nmol·g ⁻¹ Utilización de un sistema de multi bucles para la colecta de fracciones de la primera dimensión	Plasma de ratón	148
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Ser y Ala	"heart cut" LC-LC	Columna capilar monolítica (750 x 0.53 mm) Acetonitrilo/TFA 0.05 % (gradiente) FLD	Columna quiral SumichiralOA-2500S (250 x 1.5 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 3 mM en metanol (75:25, v/v) FLD	LD < 500 amol/inyeccion Utilización de un sistema de bucle interno. Concentración de D-aa en muestra de 50 nmol·g ⁻¹	Cerebro de rata	395

Tabla 16 (Continuación) .Determinación quiral de distintos analitos en diversas matrices mediante acoplamientos cromatográficos de tipo aquiral-quiral

Analitos	Tipo de acoplamiento	1° Dimensión	2° Dimensión	Observaciones	Muestra	Ref.
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Ser y Ala	"heart cut" LC-LC	Columna capilar monolítica (750 x 0.53 mm) Acetonitrilo/TFA 0.05 % (gradiente) FLD	Columna quiral SumichiralOA-2500S (250 x 1.5 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 5 mM en metanol (50:50, v/v) FLD	LD < 500 amol/inyeccion Utilización de un sistema de bucle interno.	Fluidos biológicos de ratón	363
Enantiómeros de los OPA derivados del Asp y enantiómeros de la Phe	"heart cut" LC-LC	Columna C ₈ Zorbax Eclipse XDB (150 x 4.6 mm) Metanol/sulfato de Cu ²⁺ 2 mM (20:80, v/v) FLD-UV (254 nm)	Columna quiral de intercambio de ligando Chirex 3126 D- penicilamina (250 x 4.6 mm) Metanol/sulfato de Cu ²⁺ 2 mM (20:80, v/v) FLD-UV (254 nm)	LD ~ 0.16-0.52 µg·mL ⁻¹ Utilización de una válvula de seis puertos sin necesidad de bucles internos	Coca-cola Zero®	396
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Pro e hidroxi-Pro	"heart cut" LC-LC	Columna capilar monolítica (500 x 0.53 mm) Metanol/TFA/agua (2:0.02:98, v/v/v) FLD	Columna quiral Chiralpak QD-2-AX (150 x 1.5 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 10 mM en metanol (50:50, v/v) FLD	LD < 1 fmol Utilización de una válvula de seis puertos sin necesidad de bucles internos	Suero de ratón	397
Enantiómeros de los derivados NBD-F de Pro y Asp	"heart cut" LC-LC	Columna capilar monolítica (750 x 0.53 mm) Acetonitrilo/TFA/agua (8:0.05:92, v/v/v) FLD	Columna quiral SumichiralOA-2500S (250 x 1.5 mm) Acetonitrilo/ácido cítrico 2 mM en metanol (50:50, v/v) FLD	LD < 0.625 nmol·g ⁻¹ Utilización de un sistema de multi bucles para la colecta de fracciones de la primera dimensión Transferencia de 150 s	Tejidos de ratón	364

6. TRATAMIENTO DE DATOS

En este capítulo se recoge un resumen de los principales procedimientos quimiométricos, estadísticos y herramientas informáticas de tratamiento de señales aplicadas en el procesado de los datos de esta tesis doctoral.

6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

La comparación de diversos conjuntos de resultados es habitual en los laboratorios analíticos. Así, por ejemplo, puede interesar comparar diversos métodos de análisis con diferentes características, diversos analistas entre sí o una serie de laboratorios que analizan una misma muestra con el mismo método (ensayos colaborativos). En todos estos ejemplos hay dos posibles fuentes de variación: una es el **error aleatorio en la medida** y la otra es lo que se denomina **factor controlado** (tipo de método, diferentes condiciones, analista o laboratorio, etc.). Ante todas estas posibilidades, se hace necesario el uso de herramientas estadísticas que permitan establecer las diferencias significativas entre los parámetros que se están comparando.

6.1.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Una de las herramientas estadísticas más utilizadas que permite la separación de las diversas fuentes de variación es el **análisis de la varianza** (ANOVA, del inglés Analysis of Variance). ANOVA descompone la varianza total de los datos analizados en la contribución debida a los errores aleatorios, medida a través de la varianza de las repeticiones hechas en cada grupo (laboratorio, analista o método) y la contribución debida al factor controlado (los distintos laboratorios, los distintos analistas, los distintos métodos, etc.). A continuación, compara las dos varianzas mediante un test F y decide si el factor controlado incrementa significativamente la varianza debida a los errores aleatorios. En el caso de aceptar la igualdad de varianzas, concluirá que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los distintos laboratorios, analistas, métodos, etc.

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

- Cada conjunto de datos debe ser independiente del resto.
- Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
- Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

En general, una vez realizado el análisis de la varianza, se puede realizar un **test estadístico de rango múltiple (MRT)** para determinar diferencias significativas entre pares de medias después que se ha rechazado la hipótesis nula en el análisis de la varianza (398, 399).

6.2. EVALUACIÓN QUIMIOMÉTRICA DE LOS DATOS

Se define la **Quimiometría** como la disciplina de la química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos. En otras palabras, lo que la quimiometría hace es aplicar métodos estadísticos y matemáticos a los problemas químicos con el objetivo de extraer la máxima y más útil información de los mismos. El desarrollo de la instrumentación química ha llevado a la necesidad de utilizar métodos avanzados de diseño de experimentos, calibración y análisis de los datos resultantes.

6.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN

La respuesta de muchas técnicas analíticas depende de una gran variedad de factores experimentales, que en muchas ocasiones están bajo el control del operador. Por eso es importante establecer qué valores de estos factores aseguran que la respuesta de la técnica sea óptima, de esta forma el proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de los factores que producen el mejor resultado posible en un problema analítico se conoce como optimización.

La optimización de un problema analítico o de un procedimiento analítico, debe llevarse a cabo estudiando un número de factores determinados que se identifican en tres etapas:

1. Selección de la función objeto: Seleccionar la variable o respuesta analítica que va a ser optimizada (intensidad de señal, tiempo de análisis, etc.).
2. Selección de los principales factores que afectan a la respuesta analítica: Se lleva a cabo un “screening” o barrido mediante la determinación de los efectos de los factores así como de su influencia en la medida.
3. Optimización: Es la búsqueda de la combinación de los factores que maximicen o minimicen la respuesta o respuestas analíticas.

Para alcanzar esta optimización de la respuesta analítica es preciso partir de un adecuado diseño experimental, siendo el más utilizado el denominado diseño factorial, en el que se evalúa la influencia de varios factores de forma simultánea, estudiándose el efecto conjunto de éstos sobre la respuesta experimental.

El diseño más simple es un **diseño experimental completo** 2^k , siendo el más sencillo el diseño 2^2 , donde la base 2 muestra el número de niveles de variabilidad de cada factor y k expresa el número de factores a optimizar. Este tipo de diseños se utilizan cuando el número de factores es pequeño, ya que al aumentar el número de factores, el número de experimentos aumenta drásticamente. En estos casos, se aplica un diseño factorial fraccionado expresado como 2^{k-p} , donde mediante el factor p, el número de experimentos se reduce considerablemente.

Los diseños de tres niveles, a su vez pueden ser de varios tipos: diseño completo 3^k , similares a los de dos niveles y con las mismas limitaciones anteriormente citadas; **diseños compuestos centrados**, que son una combinación de un diseño completo o fraccionado y un diseño adicional (diseño de estrella), de tal forma que si los centros de ambos diseños coinciden, se origina el diseño compuesto centrado. Los **diseños de Box-Behnken** son aquellos donde los puntos experimentales se colocan en una hiperesfera de forma equidistante al centro.

Los **diseños mixtos** se aplican si surgen problemas derivados de las relaciones adicionales entre los factores estudiados. Para solucionar los posibles problemas se puede aplicar un diseño mixto basado en una red (k-d), siendo k el número de factores y d el número de niveles o un **diseño personalizado**, donde es el propio operador quien decide tanto el número de factores a estudiar como los niveles establecidos en cada caso (398, 399).

En el caso de la cromatografía donde diferentes variables afectan al análisis, el objetivo de la quimiometría es desarrollar métodos robustos y estrategias de optimización aplicables a los problemas propios de esta técnica (selectividad, tiempo de análisis, etc). En la selectividad cromatográfica influyen un gran número de parámetros (tipo de fase estacionaria, tipo y composición de la fase móvil, pH, fuerza iónica, etc.). Debido a la gran cantidad variables y a las posibles interacciones entre ellas, la quimiometría, concretamente los procedimientos quimiométricos de optimización, constituyen herramientas útiles para diseñar un procedimiento del cual se obtenga la máxima información con el menor número posible de experimentos.

En una optimización cromatográfica mediante el uso de diseño experimental se sigue los siguientes pasos:

1. Definición de los parámetros y sus límites de variación.
2. Definición del diseño experimental.
3. Selección de un criterio adecuado de optimización.
4. Modelo matemático y determinación óptima.

Mediante estos diseños, con relativamente pocos experimentos, se pueden evaluar la influencia de cada factor y las interacciones existentes entre ellos, permitiendo llevar a cabo una optimización de la separación cromatográficas (398-399).

Teniendo en cuenta los mecanismos tan complejos involucrados en las separaciones cromatográficas quirales, es necesario controlar la cantidad de modificador orgánico en la fase móvil, el pH del medio tamponado de la misma o la temperatura de trabajo ya que dichos factores pueden afectar significativamente tanto al orden de elución de los enantiómeros como a la enantioresolución de los mismos en la CSP. Es por eso que en estos casos la aplicación del diseño experimental y el **análisis de superficie de respuesta (RSA)** se convierten en una herramienta muy útil para encontrar las condiciones óptimas de separación. Este procedimiento ha sido utilizado para la optimización de la separación quiral del diclofop-metil y diclofop ácido, dónde se hizo uso del diseño experimental para la selección de la concentración de tampón, pH del mismo y porcentaje de modificador orgánico que proporcionasen una enantioresolución superior a la unidad es un tiempo de análisis razonable (327).

Una vez obtenidas las ecuaciones que definen las superficies de respuestas experimentales, se puede hacer uso del **análisis múltirespuesta (MRA)**. Este procedimiento quimiométrico permite determinar la combinación de los factores

experimentales que optimizan simultáneamente las respuestas estudiadas y por tanto maximizan la función de deseabilidad en la región escogida. Este procedimiento fue utilizado en la optimización en la selección de las condiciones óptimas en la separación de los enantiómeros del fluazifop-butil, quizalofop-etil y mefenpyr-dietil (328).

En cromatografía líquida en fase inversa se emplean fases móviles formadas por una disolución acuosa tamponada y un modificador orgánico. Para estudiar la proporción en la que deben encontrarse ambos componentes, así como los factores que puedan influir en el proceso de separación (pH del tampón, necesidad de añadir un segundo modificador orgánico etc.) se aplican frecuentemente los diseños experimentales (400). Así por ejemplo Lumbreras y col (117) hicieron uso de varios tipos de diseño experimental para optimizar la separación cromatográfica de aminas heterocíclicas mediante cLC-MS.

El diseño experimental puede tener otras aplicaciones en cromatografía. Por ejemplo, los factores implicados en procedimientos de extracción de analitos (401) también puede ser optimizados haciendo uso de estas metodologías, o en cromatografía líquida capilar, dónde se requiere la utilización de grandes volúmenes de inyección mediante técnicas de focalización, los diseños experimentales pueden proporcionar las condiciones óptimas en las que se debe realizar dicha focalización para obtener la máxima sensibilidad (225).

6.2.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El **Análisis de Componentes Principales (PCA)** es un procedimiento estadístico de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí. Un aspecto clave en PCA es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales es decir, tanto el signo como la magnitud de las correlaciones. A continuación se describirá brevemente el fundamento de dicha técnica estadística

El PCA permite reducir la dimensionalidad de los datos, transformando el conjunto de p variables originales en otro conjunto de q variables incorrelacionadas ($q \leq p$) llamadas componentes principales. Las p variables son medidas sobre cada uno de los n individuos, obteniéndose una matriz de datos de orden np ($p < n$). En el PCA existe la opción de usar la matriz de correlaciones o bien, la matriz de covarianzas. En la primera opción se le da la misma importancia a todas y a cada una de las variables; lo cual puede ser conveniente cuando se considere que todas las variables son igualmente relevantes. La matriz de covarianzas se utiliza cuando todas las variables tengan las mismas unidades de medida y además se considere conveniente destacar cada una de las variables en función de su grado de variabilidad.

Los componentes se ordenan en función del porcentaje de varianza explicada. En este sentido, el primer componente será el más importante por ser el que explica mayor porcentaje de la varianza de los datos, quedando a criterio el decidir cuántos componentes se elegirán en el estudio. Los únicos requerimientos previos para la aplicación del PCA son la continuidad en las variables y que el número n de individuos o elementos observados debe ser mayor a p o número de variables originales. Por otra parte no exige ni la normalidad ni la homoscedasticidad de los datos originales.

Entre los usos más frecuentes del PCA se pueden destacar:

- Técnica de análisis exploratorio que permite determinar interrelaciones entre los datos y de acuerdo con los resultados, proponer los análisis estadísticos más apropiados.
- Reducir la dimensionalidad de la matriz de datos con el fin de evitar redundancias y destacar relaciones. En la mayoría de los casos, tomando sólo los primeros componentes, se puede explicar la mayor parte de la variación total contenida en los datos originales.
- Construir variables no observables (componentes) a partir de variables observables.
- Bajo ciertas circunstancias, es de gran utilidad usar los componentes incorrelacionados, como datos de entrada para otros análisis. Por ejemplo, en el caso de la regresión múltiple cuando las variables independientes presentan alta colinealidad es preferible hacer la regresión sobre los componentes principales en lugar de usar las variables originales (399).

En química analítica, el uso de herramientas quimométricas como el PCA se está mostrando como herramienta útil en el campo de análisis de alimentos. La autenticidad y la trazabilidad son dos de los aspectos más importantes en la cadena

alimentaria. La autenticidad en particular, está estrechamente relacionada con los problemas de seguridad, la adulteración, la procedencia geográfica o los métodos de producción el alimento. Es en este aspecto dónde el análisis de componentes principales puede resultar de utilidad para establecer patrones ligados al origen y procedencia de los alimentos. Varios son los ejemplos recogidos en bibliografía que emplean dicho método para estudios de denominación de origen y autenticación de alimentos propios de comarcas o regiones, como carnes, mieles, quesos, vinos, café, frutas, frutos secos, aceites, hortalizas o aguas de manantial (402-411).

Algunos autores han hecho uso del PCA para establecer las variaciones producidas en alimentos que han sido sometidos a algún tipo de tratamiento o procesado. Por ejemplo Liu y col. (412) han estudiado las variaciones producidas por en la humedad del maíz sometido a tratamientos de secado. El tratamiento estadístico determinó la correlación entre el tipo de tratamiento y los efectos producidos en el alimento. Tal y como se ha comentado en otros puntos de la memoria, el tratamiento higienizante con radiaciones ionizantes, puede provocar dependiendo de la dosis y del tipo de alimentos, algunas alteraciones tanto en la composición química como en las propiedades organolépticas de los alimentos. En el caso de alimentos listos para el consumo (RTE), el PCA permitió establecer cuales son los parámetros más afectados de los alimentos tratados con electrones acelerados, así como que tipo de alimentos son más susceptibles de sufrir modificaciones (113). Kizil y col. (413), y Seregély y col. (414) por otra parte, utilizaron el PCA para establecer patrones que diferenciasesen huevos y maíz respectivamente que habían sido sometidos a radiación y mediante el estudio de cambios físicos provocados por dicho tratamiento.

6.2.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

El ***análisis de regresión múltiple (MLR)*** es una técnica de análisis multivariante en el que se establece una relación funcional entre una variable dependiente o a explicar y una serie de variables independientes o explicativas, en la que se estiman los coeficientes de regresión que determinan el efecto que las variaciones de las variables independientes tienen sobre el comportamiento de la variable dependiente. El modelo más utilizado es el modelo lineal, pues es el que requiere estimar un menor número de parámetros.

La medida de la bondad del ajuste de la función estimada viene dada por el coeficiente de correlación múltiple, y el coeficiente de determinación, que es el cuadrado del anterior y que expresa la proporción de la varianza de la variable dependiente explicada por el modelo de regresión. El coeficiente de correlación parcial de cada variable explicativa, indica la relación específica de dicha variable con la variable dependiente, supuesto que permanecen constantes las demás variables independientes. En este tipo de análisis es frecuente la existencia de multicolinealidad, es decir, que las variables explicativas estén altamente correlacionadas entre sí, lo que perturba la interpretación de los coeficientes de regresión. El modelo de regresión requiere que todas las variables, dependientes e independientes, estén autoescaladas o normalizadas (398).

6.3. APLICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS DE DECONVOLUCIÓN AL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Uno de los principales objetivos de las técnicas cromatográficas es conseguir una separación adecuada de los analitos de interés en un tiempo de análisis razonable. En muchos casos, la resolución completa no llega a ser posible, situación que se da de forma frecuente en compuestos pertenecientes a la misma familia, donde las interacciones con la fase estacionaria son similares, o en el caso de las separaciones quirales, donde la separación de los enantiómeros depende de múltiples factores. La selectividad y por tanto la mejora de la resolución cromatográfica, se suele acrecentar modificando las condiciones cromatográficas, aunque en muchos casos la resolución total o aceptable de los picos no se llega a conseguir y por tanto la cuantificación puede conllevar errores importantes (415).

La **deconvolución** es una herramienta matemática poderosa cuyo fin es la mejora de la selectividad ofrecida por un método de análisis. Una de sus principales aplicaciones son las separaciones cromatográficas en donde las señales de los picos parcialmente resueltos se pueden descomponer en sus contribuciones individuales, garantizando una más precisa estimación de las áreas de pico y por tanto, minimizando los errores de cuantificación. Sin embargo, hasta ahora, estas herramientas requerían de un conocimiento especializado o de paquetes de software complicados que hacían que su aplicación en el análisis de rutina fuese limitada (416). En la actualidad, la posibilidad de utilizar paquetes informáticos sencillos a nivel usuario tales como Matlab (417) o Microsoft Excel (418) para tratamientos de

deconvolución de las señales cromatográficas, hacen que estas herramientas se estén implementando como habituales en muchos laboratorios. El verdadero problema de las herramientas de deconvolución es la correcta elección de la función que describe los picos cromatográficos. En la literatura se recogen un gran número de funciones aplicadas a la deconvolución de picos cromatográficos tales como la distribución Gaussiana (GD), la función exponencial generalizada (GEX), la función Lorentziana o la **función Gaussiana exponencialmente modificada** (EMG), siendo esta última una de las más utilizadas (419-421).

Dentro de la cromatografía, las herramientas de deconvolución pueden ser útiles en el campo de las separaciones bidimensionales (422) o en la determinación de pesticidas en muestras muy complejas, donde incluso en las condiciones de separación óptima no se consigue la completa resolución de todos los picos (423). El mayor potencial de estas herramientas recae en las separaciones quirales (328, 424-426) en las cuales resulta muy difícil conseguir una enantioresolución total de los dos isómeros en un tiempo de análisis razonable. Normalmente las resoluciones obtenidas son menores a la unidad, quedando así la pareja de enantiómeros parcialmente superpuesta. Por otra parte, los mecanismos de separación en cromatografía quiral, sufren una cinética y termodinámica de transferencia de masa más lenta que en cualquier otro tipo de cromatografía, lo que hace que los picos cromatográficos presenten colas pronunciadas.

En estas circunstancias, los métodos de integración manuales que ofrecen los software de los equipos, basados en el "split" de picos, integración "valle a valle" o el "método de la caída del valle" (VDM) resultan poco eficaces, ya que generan picos sesgados que conllevan a errores en el cálculo de las áreas de pico y consecuentemente, a errores en la cuantificación o estimación de las relaciones o fracciones enantioméricas. La aplicación de modelos matemáticos de deconvolución parece ser una estrategia eficaz para el tratamiento de la señal cromatográfica en estos casos, ya que minimiza un 40% los errores asociados al sesgo de los picos y por tanto proporciona resultados más exactos, haciendo que estas herramientas sean clave para el cálculo de fracciones o relaciones enantioméricas en análisis de muestras medioambientales o biológicas, donde los errores asociados a la estimación de las áreas de pico conllevan graves errores en el cálculo de dichos parámetros.

A decorative background featuring a cluster of semi-transparent spheres in shades of red and purple, arranged in a roughly circular pattern around the central text.

Finalidad y Planteamiento

FINALIDAD Y PLANTEAMIENTO

La revisión bibliográfica realizada en el capítulo anterior ha puesto de manifiesto el interés existente en la actualidad por la determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos, ya que en el caso de los herbicidas, su toxicidad y acción depende de la forma enantiomérica en la que se encuentren, mientras que la calidad, valor nutricional y seguridad de un alimento, dependerá por otra parte de la presencia de D-aminoácidos.

El trabajo presentado en esta tesis doctoral tiene entre sus objetivos la puesta a punto de nuevas metodologías para la determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos en matrices de interés medioambiental y agroalimentario, con el fin de evaluar su incidencia en el medioambiente y en la salud humana.

Por tanto, teniendo en cuenta dichas premisas, los objetivos específicos planteados en la presente tesis se definen a continuación:

1. Desarrollo y optimización de métodos de separación enantiomérica mediante cromatografía líquida quiral directa tanto de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y diclofop-ácido, diclofop-metil, quizalofop-etil y fluazifop-butil y del herbicida protector mefenpyr-dietil, como de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano empleando fases estacionarias quirales basadas en una α_1 -glicoproteína ácida (CHIRAL-AGP) y en el antibiótico macrocíclico teicoplanina (CHIROBIOTIC-T).
2. Estudio de las variables que afectan a la separación quiral de dichos analitos (proporción y tipo de modificador orgánico en la fase móvil, pH de la disolución reguladora, temperatura de la columna y de la fase móvil), mediante el uso de diseños experimentales y análisis de superficie de respuesta, con el fin de obtener las condiciones de separación óptimas que proporcionen una resolución aceptable entre los dos enantiómeros en tiempos de análisis no excesivamente largos.
3. Evaluación de las posibilidades de las herramientas informáticas de deconvolución de picos cromatográficos. Para ello, se estudiarán varios modelos matemáticos y se determinará la resolución, la relación (ER) y la fracción enantiomérica (EF), comparando dichos resultados con los

proporcionados por el método manual de integración de la caída del valle (VDM) para establecer la aplicabilidad de dichas herramientas como métodos de integración de rutina para la obtención de resultados fiables.

4. Desarrollo y optimización de un acoplamiento cromatográfico bidimensional de tipo HPLC quiral-HPLC quiral para el análisis enantiomérico directo tanto de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos como de aminoácidos. Para ello se establecerán las condiciones de separación ortogonales para los sistemas cromatográficos a acoplar, prestando especial atención a la optimización de la separación cromatográfica primaria en la primera dimensión de dichos analitos y al tiempo óptimo de transferencia entre esta primera dimensión y la columna quiral.
5. Las metodologías anteriormente expuestas se aplicarán al análisis quiral de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y de tipo protector seleccionados en muestras de suelo de elevado contenido orgánico y en un preparado comercial de uso frecuente, cuando estos analitos están presentes en forma racémica o en distintas proporciones enantioméricas R-(+)/S-(-). Por otra parte, se evaluará el efecto de la radiación ionizante en dosis comprendidas entre 1-8 kGy tanto en el contenido de aminoácidos libres como en la racemización de los mismos en alimentos listos para el consumo RTE (jamón cocido y serrano, hamburguesas, queso en lonchas y salmón ahumado). Así mismo, se hará uso de herramientas quimiométricas tales como el análisis de componentes principales (PCA), análisis de la varianza (ANOVA), test de rango múltiple (MRT) y regresión lineal múltiple (MLR), para establecer modelos que permitan predecir las alteraciones que se producen en los alimentos tratados con radiaciones ionizantes según la dosis aplicada, identificar las causas de los cambios observados y por tanto establecer una relación entre ellos.

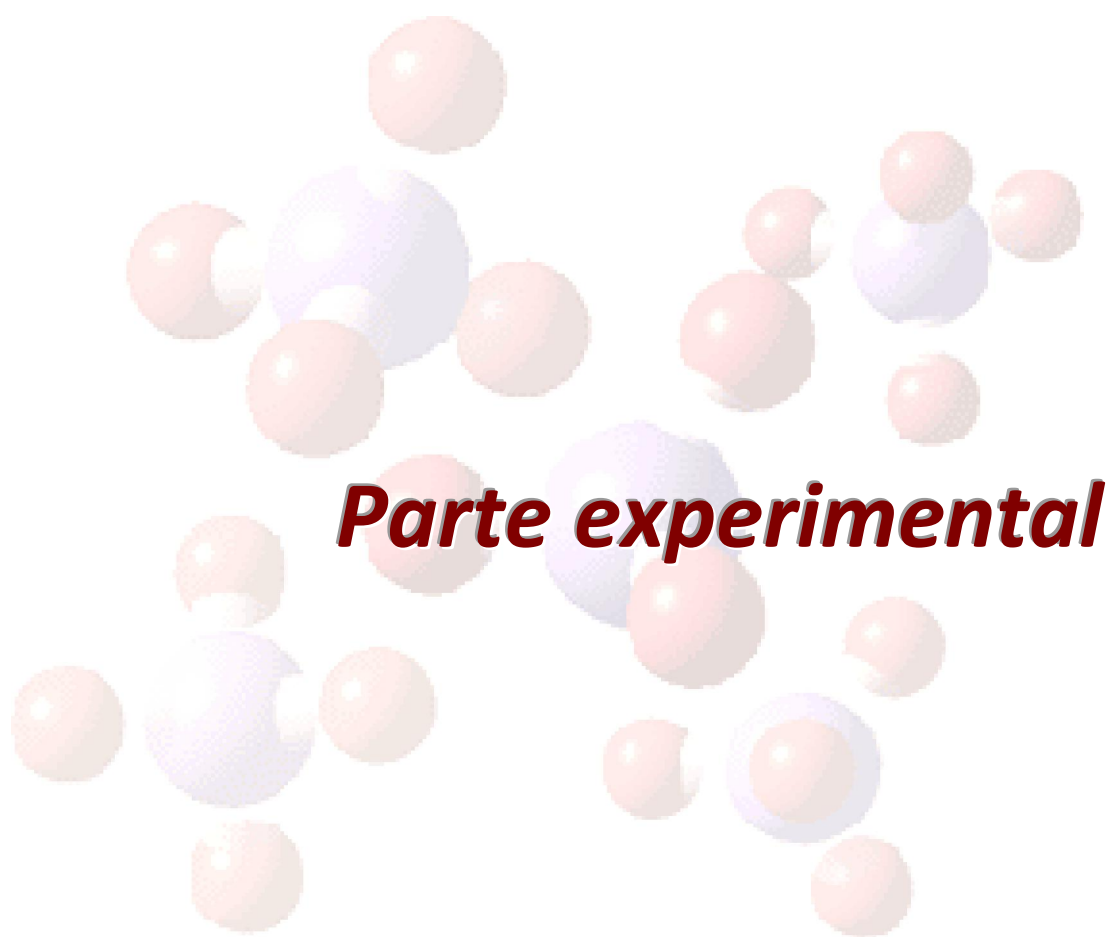
Puesto que la cromatografía líquida capilar acoplada a espectrometría de masas proporciona sensibilidad adecuada, consume pequeñas cantidades de disolventes orgánicos y genera pocos residuos, dentro de los objetivos de esta tesis también se incluye el desarrollo de metodologías de análisis de compuestos de interés alimentario que se encuentren en concentraciones muy bajas, considerando las particularidades de este tipo de técnicas. En este aspecto, los objetivos marcados son:

1. Estudio de las variables que afectan a la eficacia de ionización en ESI-MS y establecimiento de las condiciones de focalización en cabeza de columna que permitan alcanzar la máxima sensibilidad en la determinación cromatográfica

de la serotonina y sus precursores mediante cLC-MS, mediante el uso de diseños experimentales y análisis de superficie de respuesta.

2. Determinación de serotonina y sus precursores L-triptófano y 5-OH-triptófano en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao (70-100%).

Por otra parte, otro de los grandes objetivos de esta tesis, es la puesta a punto de nuevas metodologías de tratamiento de muestra más sencillas y eficaces a los tratamientos convencionales de hidrólisis ácidas o básicas y que a su vez proporcionen altos rendimientos de extracción y por tanto recuperaciones satisfactorias. Debido a la posibilidad de hidrólisis especialmente de los ésteres de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos considerados y a la facilidad de interconversión, destrucción y racemización tanto de los aminoácidos como de los herbicidas; en esta tesis se desarrollarán tratamientos de muestra suaves, rápidos sencillos y no agresivos, que eviten la transformación y degradación de las especies y mantengan la integridad de los analitos.



1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MATERIAL

1.1. INSTRUMENTACIÓN

1.1.1. EQUIPOS DE HPLC CONVENCIONAL CON DETECCIÓN UV/VIS

- **Cromatógrafo de líquidos Beckman (Fullerton, CA, USA)**

Constituido por módulo de disolventes modelo 125 S System Gold® con doble bomba y sistema binario de mezcla de disolventes en alta presión, válvula de inyección de seis vías Rheodyne® con bucle externo reemplazable de 20.0 μ L modelo EV 700-100, detector UV-vis modelo 166 System Gold® de longitud de onda variable y programable, equipado con célula de flujo de 11 μ L y 1 cm de paso óptico. El control de equipo y el procesamiento de los datos se ha realizado mediante el programa Gold Noveau® Chromatography Workstation Software (v 1.6) para Windows, que ha permitido el procesamiento de los resultados.

1.1.2. EQUIPOS DE SEPARACIÓN BIDIMENSIONAL LC aquiral-LC quiral CON DETECCIÓN UV/VIS

La figura 16 muestra la configuración utilizada en el acoplamiento cromatográfico desarrollado, compuesto por dos cromatógrafos (sistemas 1 y 2) y válvula de desplazamiento de seis vías modelo Lab Pro de Rheodyne.

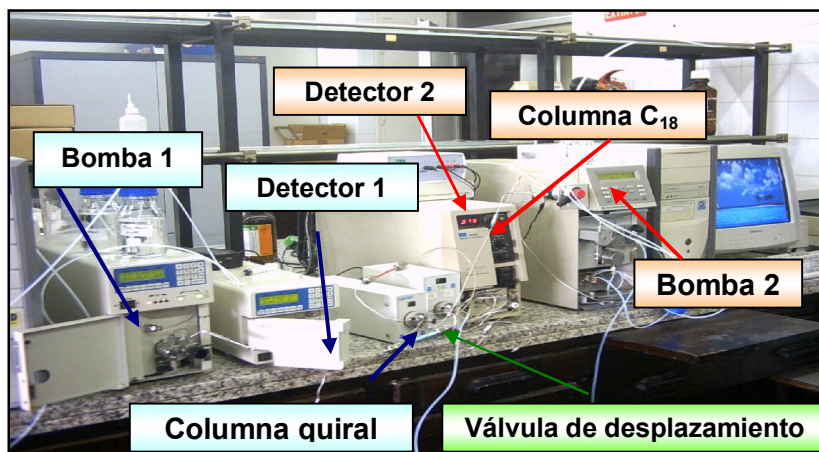


Figura 16. Equipo LC aquiral-LC quiral con dos detectores UV-vis

▪ **Sistema 1**

El sistema 1 está constituido por cromatógrafo de líquidos Jasco (Tokio, Japón) con un módulo de disolventes modelo PV-2089 Plus, con bomba de cuatro canales y sistema cuaternario de gradiente, válvula de inyección de seis vías Rheodyne® con bucle externo reemplazable de 20.0 µL modelo EV 700-100, detector UV-vis modelo UV-2075 Plus de longitud de onda variable y programable, equipado con célula de flujo de 11 µL y 1 cm de paso óptico, termostatizador de columnas modelo CO-2067 Plus con temperatura programable (10-80 °C), baño termostatizador para fase móvil modelo Tectron 200 de P-Selecta. Todo ello interconectado a un ordenador mediante la interfase Jasco-Borwin LC-Net II/ADC. El control de equipo se realiza mediante el programa Borwin Chromatography Workstation Software (v 1.5) para Windows, que también permite la adquisición y tratamiento de los datos.

En dicho sistema se llevan a cabo las separaciones quirales, utilizando las siguientes columnas cromatográficas:

- Columna con fase estacionaria de α_1 -glicoproteína ácida CHIRAL-AGPTM, de 100 x 3 mm I.D. y tamaño de partícula 5 µm (Chrom-Tech, Cheshire, Reino Unido).
- Columna con fase estacionaria de teicoplanina CHIROBIOTIC T, de 150 x 2.1 mm I.D. y tamaño de partícula 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

▪ **Sistema 2**

El sistema 2 está constituido por cromatógrafo de líquidos con una bomba modelo Spectra Series P100 de Thermo Separation Products con sistema binario de mezcla de disolventes, válvula de inyección de seis vías Rheodyne® con bucle externo reemplazable de 20.0 µL modelo EV 700-100, detector UV-vis modelo 481 de Waters con longitud de onda variable equipado con célula de flujo de 11 µL y 1 cm de paso óptico. El control de equipo se ha realizado mediante el programa CromaNec Workstation, compuesto por el sistema de detección de picos Micronec y el software CromaNec para Windows XP, que ha permitido el procesamiento de los resultados.

En dicho sistema se llevan a cabo las separaciones aquirales en fase inversa utilizando las siguientes columnas cromatográficas:

- Columna de fase inversa Atlantis dC₁₈ 150 x 4.6 mm I.D., de tamaño de partícula 5 µm, porosidad 69%, diámetro de poro medio 99 Å y área superficial 323 m²·g⁻¹ (Waters, Milford, Massachusetts, USA), acoplada a una pre-columna SUPERCOSIL-C18 Pelliguard 20 x 4.4 mm I.D, de tamaño de partícula 40 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Columna de fase inversa C₁₈-Luna 150 x 4.6 mm I.D., de tamaño de partícula 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA).
- Columna de fase inversa RP Amide C₁₆ 150 x 4.6 mm I.D., de tamaño de partícula 5 µm, diámetro de poro medio 180 Å y área superficial 200 m² g⁻¹ (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Columna de cromatografía de interacción hidrofílica Kinetex™ HILIC 150 x 2.1 mm I.D., de tamaño de partícula 2.6 µm (Phenomenex, Torrance, CA).

1.1.3. EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR CON DETECCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El sistema cromatográfico modelo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, España), consta de los siguientes elementos: módulo de disolventes con bomba binaria capilar G1376 A y degasificador G1379 A incorporado, detector de diodos en serie G1315B con célula de flujo de 500 nL y 10 mm de paso óptico, detector de masas cuadrupolo Agilent 6120 equipado con un micronebulizador de electrospray, válvula de inyección Cheminert™ con bucle interno de 100 nL (LC Packings, Amsterdam, Holanda), válvula de inyección de seis vías Rheodyne® con bucle interno de volumen 2.0 µL y bucles externos reemplazables de 5.0, 10.0 y 20.0 µL (Beckman, Fullerton, CA, USA) y horno programable MISTRAL para la termostatación de columnas (Beckman, Fullerton, CA, USA). Se han utilizado conexiones de PEEK de 50 y 75 µm de diámetro interno y mangas, también de este material, para conectar tubería capilar adecuada al diámetro externo de la columna capilar empleada. El control de equipo se ha realizado mediante el programa Agilent Chemstation G2170AA para sistemas LC y módulo espectral de evaluación G2180AA para el sistema operativo Microsoft Windows XP Professional.

Las columnas cromatográficas utilizadas en este equipo se describen a continuación:

- Columna capilar de fase inversa Zorbax SB-C₁₈ 150 x 0.5 mm I.D., de tamaño de partícula 5 µm (figura 18) (Agilent Technologies, España)
- Columna capilar de fase inversa Luna-C₈ 150 x 0.3 mm I.D., de tamaño de partícula 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA).
- Columna capilar de fase inversa Luna-C₁₈ 150 x 0.3 mm I.D., de tamaño de partícula 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA).
- Columna capilar de fase inversa Synergi MAX-RP 150 x 0.3 mm I.D., de tamaño de partícula 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA).
- Columna capilar de fase inversa Synergi Fusion 150 x 0.3 mm I.D., de tamaño de partícula 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA).

En la figura 17 se muestra la disposición de los diferentes elementos.

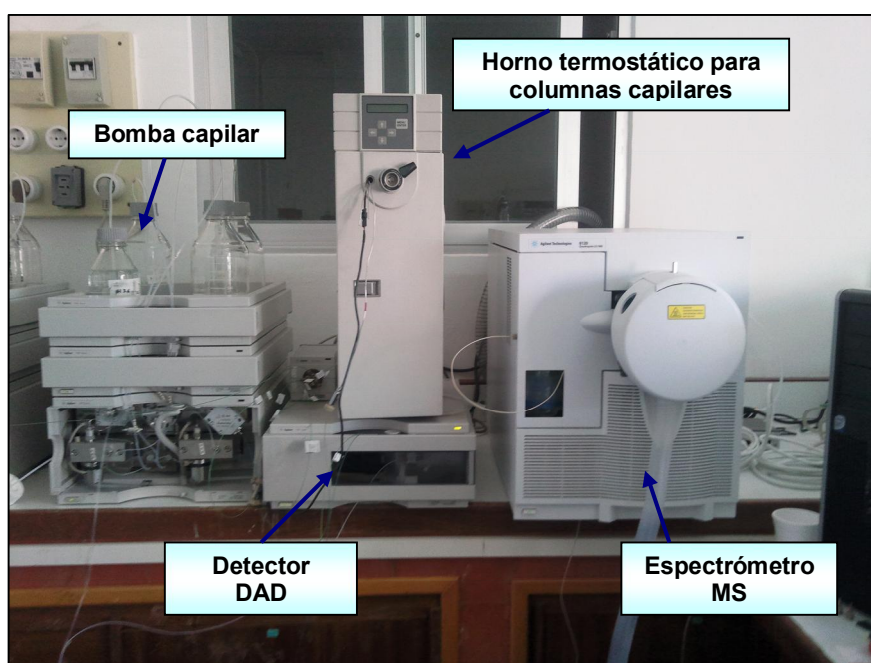


Figura 17. Equipo de cromatografía líquida capilar con detector de matriz de Diodo y de espectrometría de masas.

1.1.4. OTROS EQUIPOS

▪ Espectrofotómetros UV/VIS

1. Espectrofotómetro de matriz de diodos HP 8543, unido a través de una interfase a un ordenador HP Kayak XA que contiene el programa HP Chemstation y a su vez está conectado a una impresora HP Deskjet 895 Cxi (Agilent Technologies, España). Para medidas en discontinuo

se ha utilizado una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y para medidas en continuo, una cubeta de flujo de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 18 μ L de volumen.

2. Colorímetro digital de longitud de onda variable modelo Spectronic 200 marca Milton Roy (Milton Roy, España) para la realización de las medidas de absorbancia de nitratos y nitritos presentes en muestras.

▪ **Sistemas utilizados en la preparación de muestra**

1. Baño de ultrasonidos de 6 L de capacidad y temperatura regulable (máximo 65 °C) y tiempo (30 min) controlable (Selecta, Barcelona).
2. Homoginizador Vortex VELP Scientifica (Usmate, Italia).
3. Agitador mecánico modelo Vibromatic de P-Selecta (Selecta, Barcelona)
4. Sistema de extracción en fase sólida Varian para la extracción simultánea de 20 muestras (Harbor City, CA, USA) acoplada a una bomba de membrana P-Selecta (Selecta, Barcelona) para su funcionamiento a vacío. Dicho sistema se conectó a un colector de vacío Varian VacElut 20 para evaporación bajo corriente de nitrógeno.
5. Centrífuga modelo 21 suministrada por Ortoalresa (Madrid, España).
6. Estufa P-Selecta de temperatura programable (10-200 °C) equipada con discos de cerámica de Panreac (Barcelona, España).
7. Horno de mufla modelo L-B180 de Comecta para temperaturas regulables hasta 1100 °C y capacidad de 5 L (Barcelona, España).
8. Baño termostático de temperatura programable (10-100 °C) P-Selecta (Barcelona, España).

▪ **Equipos auxiliares.**

1. pH-metro estándar modelo pH 555 de Teknokroma con electrodo combinado de vidrio Crison 52-02 y referencia interna Ag/AgCl (Barcelona, España).
2. Conductivímetro portátil modelo C35 de Crison (Barcelona, España).
3. Bomba de membrana P-Selecta para la filtración de fases móviles a vacío (Barcelona, España).
4. Agitador magnético con control de temperatura hasta 400 °C de VELP Scientifica (Usmate, Italia).

5. Balanza analítica digital Sartorius Basic, de precisión 0.1 mg (Frankfurt, Alemania).
6. Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).
7. Refrigerador de 0 a 4 °C para la conservación de patrones, tampones y otras disoluciones.
8. Bomba digital Series II de preparativa para preconcentración de muestras en discontinuo y limpieza de columnas capaz de suministrar hasta 10.0 mL min⁻¹ (Konik-Tech, Madrid, España).
9. Bloque de digestión Kjeldhal y destilador Vapodest de Gerhardt (Königswinter, Alemania) conectados a un depurador B-414 de BUCHI (Flawil, Suiza).
10. Equipo de extracción acelerada con disolventes Dionex ASE 200 equipado con celdas de extracción de acero inoxidable de 11-22 mL y viales colectores de 40 mL (Sunnyvale, USA).

1.2. REACTIVOS Y MATERIAL

1.2.1. MATERIAL DE FILTRACIÓN DE MUESTRAS Y FASES MÓVILES

- Membranas de nailon 66 (Ø 47 mm), tamaño de poro 0.45 µm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Membranas de nailon 66 (Ø 47 mm), tamaño de poro 0.22 µm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Filtro de jeringa de nailon (Ø 25 mm) de tamaño de poro 0.45 µm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Filtro de jeringa de nailon (Ø 25 mm) de tamaño de poro 0.20 µm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Filtro de jeringa de PTEF (Ø 25 mm) de tamaño de poro 0.20 µm (Scharlab, Barcelona, España).
- Papel filtro para análisis gravimétrico, contenido en cenizas de 0.000017 g por unidad de disco (Anoia, Barcelona, España).

1.2.2. MATERIAL DIVERSO

- Material de vidrio; matraces aforados de clase A de 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250 y 1000 mL de MBL, pipetas de clase A de 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mL de MBL, vasos de precipitados de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL de Pyrex, bureta de clase A de 50 mL, probetas de 10, 25, 50 y 100 mL, matraces erlenmeyer de 250 mL de Pyrex, matraz kitasato de 250 mL de M.B.L.
- Sistema de filtración a vacío de fases móviles de cromatografía de líquidos (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Mortero cerámico.
- Micropipetas Brand regulables de émbolo capilar con puntas de vidrio de 25 y 100 μ L.
- Micropipetas regulables de émbolo capilar de capacidad con puntas desechables 2-20 μ L y 20-200 μ L suministradas por Hirschmann® Laborgerate.
- Jeringa Hamilton de 50 μ L.
- Jeringa Hamilton de 1 mL.
- Termómetro capaz de medir hasta 100 °C.
- Material de vidrio diverso: pipetas Pasteur, frascos topacio para almacenaje de disoluciones, viales topacio de 4 mL y 12 mL para almacenaje de muestras, frascos para fase la fase móvil de HPLC, etc.
- Embudo büchner.
- Embudo de extracción líquido-líquido.
- Columna de vidrio con filtro poroso.
- Tubos de centrifuga de vidrio y PTFE de 30 mL.
- Juego de tamices normalizado para análisis de granulometría de suelos.
- Frascos de PTFE de 100 mL de capacidad.
- Máquina cortadora eléctrica.
- Máquina de envasado al vacío.

1.2.3. SOFTWARE PARA TRATAMIENTO DE DATOS

- Paquete informático Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA.) para tratamiento estadístico de los datos.
- Paquete informático Statgraphics CENTURION XV versión 15.2.11 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA.) para tratamiento estadístico de los datos.

- Paquete informático PeakFit versión 4.12 (SeaSolve Inc, San Jose, CA, USA) empleado para tratamientos de deconvolución y modelización de las separaciones cromatográficas.

1.2.4. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- **Patrones de herbicidas**

Las principales características de los herbicidas incluidos en el presente estudio se muestran en la tabla 17. Sus disoluciones patrón, de concentración exactamente conocida y del orden de 200 mg L⁻¹, se han preparado en metanol y se han conservado a 4 °C en la oscuridad durante un periodo máximo de 3 meses.

Tabla 17. Características de los herbicidas empleados

Nombre Común	Pureza (%)	Proveedor
diclofop-ácido	99.4	Ehrensturfer Quality
diclofop-metil	96.5	
quizalofop-etil	99.7	Pestanal® Riedel-de-Haën
quizalofop-P-etil	98.2	
fluazifop-butil	98.8	Pestanal® Fluka
fluazifop-P-butil	96.1	
mefenpyr-dietil	99.7	Pestanal® Riedel-de-Haën

Por dilución adecuada de estos patrones en la correspondiente fase móvil, se han obtenido disoluciones de trabajo de los herbicidas con la concentración adecuada para cada uno de los experimentos realizados. Para prevenir la influencia en los resultados de la posible degradación de los pesticidas, estas disoluciones se han preparado diariamente.

- **Patrones de aminoácidos**

Las principales características de los aminoácidos y derivados incluidos en el presente estudio se muestran en la tabla 18. Sus disoluciones patrón, de

concentración exactamente conocida y del orden de 1000 mg L^{-1} , se han preparado en agua y se han conservado a 4°C en la oscuridad durante un periodo máximo de 1 mes. Por dilución adecuada de estos patrones en la correspondiente fase móvil, se han obtenido disoluciones de trabajo de los aminoácidos con la concentración adecuada para cada uno de los experimentos realizados.

Tabla 18. Características de los aminoácidos empleados

Nombre Común	Pureza (%)	Proveedor
L-tirosina	≥ 98	Sigma-Aldich
D-tirosina	99	
D,L- <i>m</i> -tirosina	≥ 98	
D,L- <i>o</i> -Tirosina	≥ 99	
L-fenilalanina	≥ 98	
L-fenilalanina		
L-triptófano		
D-triptófano		
5-hidroxi-L-triptófano		
Serotonina		

Para prevenir la influencia en los resultados de la posible degradación de los aminoácidos, estas disoluciones se han preparado diariamente.

▪ Ácidos

- Ácido clorhídrico 35%, ácido nítrico 60%, ácido sulfúrico 96% y ácido bórico para análisis (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido acético glacial 99.5%, ácido fórmico 90% (Carlo Erba, Milán, Italia).
- Ácido L-ascórbico 99.5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

▪ Disolventes orgánicos

- Metanol, acetonitrilo, acetona, 2-propanol, n-hexano, diclorometano y etil acetato de calidad gradiente HPLC (Scharlab, Barcelona, España).
- Metanol, acetonitrilo para espectrometría de masas (Scharlab, Barcelona, España).

- Éter de petróleo (bp. 40-60 °C) (Panreac, Barcelona, España).
- **Otros reactivos**
 - Hidróxido sódico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato de sodio 99%, acetato amónico, carbonato sódico, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de zinc heptahidratado, hexacianoferrato potásico, disodio etilendiamina tetraacetato dihidratado (EDTA), sulfanilamida, N-1-naftiletildiamina dihidroclórica para análisis (Panreac, Barcelona, España).
 - Hidróxido amónico (máx. 33% NH₃) y nitrito de sodio extra puro (Riedel de Hæn, Seelze, Alemania).
 - Gránulos de cadmio de 3-6 mm para análisis (Merck, Darmstadt, Germany).
 - Tierra de diatomeas (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA).
 - Rojo de metilo y azul de metileno (Panreac, Barcelona, España).
 - Nitrato de potasio 99.5% y nitrito sódico 99 % calidad analítica (Carlo Erba, Milán, Italia).
 - Tabletas de selenio libres de mercurio para catalizador Kjeldhal y gránulos porosos de carbono activo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
 - Tubos de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS) de 50 mL (sulfato magnésico + PSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

▪ **Disoluciones reguladoras**

a) Disolución reguladora de dihidrógeno fosfato de sodio 0.5 M: Se disuelven 34.5 g del producto comercial en 500 mL de agua.

b) Disolución reguladora de acetato amónico 0.5 M: Se disuelven 19.27 g del producto comercial en 500 mL de agua.

c) Disolución reguladora de formiato amónico 0.2 M: Se pesa una cantidad conocida de ácido fórmico, del orden de 0.920 g y se lleva a un volumen aproximado de un litro y se ajusta el pH 4 ó 6 con una disolución de hidróxido amónico diluido.

d) Disolución reguladora de acetato amónico 0.2 M: Se pesa una cantidad conocida de ácido acético, del orden de 1.2 g, se lleva a un volumen aproximado de un litro y se ajusta el pH a 4 ó 6 con una disolución de hidróxido amónico diluido.

Todas estas disoluciones se guardan en frasco topacio y se conservan en frigorífico a 4 °C.

▪ **Fases móviles**

En todos los casos, las disoluciones de fase móvil son preparadas en el día. Como paso previo a su utilización, se ha llevado a cabo la filtración con membranas de nailon de diámetro de poro 0.45 μm y 0.20 μm en cromatografía de líquidos convencional y cromatografía con columnas de diámetro interno reducido respectivamente. Además, en los equipos de cromatografía líquida sin desgasificador incorporado, han sido continuamente desgasificadas con helio (Air Liquide) durante la estabilización de la columna y el análisis cromatográfico.

a) Fases móviles tampón fosfato / 2-propanol: Se preparan disoluciones reguladoras de distinta concentración tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre, ajustando el pH con NaOH 1M y llevando a un volumen final de 250 mL ó 500 mL con agua Milli-Q. Se añade la cantidad adecuada de 2-propanol hasta llegar a la composición requerida.

b) Fases móviles tampón fosfato / metanol: Se preparan disoluciones reguladoras de distinta concentración tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre, ajustando el pH con NaOH 1M y llevando a un volumen final de 250 mL ó 500 mL con agua Milli-Q. Se añade la cantidad adecuada de metanol hasta llegar a la composición requerida.

c) Fases móviles tampón acetato / metanol: Se preparan disoluciones reguladoras de distinta concentración tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre, ajustando el pH con HCl 1 M y llevando a un volumen final de 250 mL ó 500 mL con agua Milli-Q. Se añade la cantidad adecuada de metanol hasta llegar a la composición requerida.

d) Fases móviles agua / metanol: Se preparan disoluciones fases móviles de distinta composición tomando distintos volúmenes de MeOH llevando a un volumen final de 500 mL o 1 L con agua Milli-Q.

e) Fases móviles tampón formiato / acetonitrilo: Se preparan disoluciones reguladoras de distinta concentración tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre de

pH 4 o pH 6 llevando a un volumen final de 250 mL ó 500 mL con agua Milli-Q. Se añade la cantidad adecuada de acetonitrilo hasta llegar a la composición requerida.

f) Fases móviles tampón acetato / acetonitrilo: Se preparan disoluciones reguladoras de distinta concentración tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre de pH 4 o pH 6 llevando a un volumen final de 250 mL ó 500 mL con agua Milli-Q. Se añade la cantidad adecuada de acetonitrilo hasta llegar a la composición requerida.

▪ **Otras disoluciones de trabajo**

a) Disolución de ácido ascórbico 100 mM: Se pesan 0.17 g del producto comercial y una vez disuelto se enrasan a 10 mL. Debe guardarse en frasco topacio y refrigerado a 4 °C. La disolución de trabajo se prepara cada día tomando los volúmenes adecuados de la disolución madre y llevando a un volumen final de 10 mL con agua Milli-Q.

b) Disolución de sulfato de cobre (II) 20 g·L⁻¹: Se pesan del orden de 20.10 g de sulfato de cobre (II) y se disuelven en 1 L de agua.

c) Disolución de sulfato de zinc 535 g·L⁻¹: Se pesan del orden de 53.50 g de sulfato de zinc (II) y se disuelven en 100 mL de agua.

d) Disolución de potasio hexacianoferrato (II) 172 g·L⁻¹: Se pesan 17.2463 g de hexacianoferrato de potasio (II) y se disuelven en 100 mL de agua.

e) Disolución de etilendiamina tetraacetato disodódico dihidratado (EDTA) 0.1M: Se pesan del orden de 33.50 g de EDTA y se disuelven en 1 L de agua.

f) Disolución de HCl 5.4M (Disolución I): Se disuelven 225 mL de HCl concentrado en 500 mL de agua.

g) Disolución de sulfanilamida 0.3 M (Disolución II): Se pesan del orden de 1.25 g de sulfanilamida y se disuelven en baño de ultrasonidos en 12.5 mL de HCl concentrado. A continuación se añaden 187.5 mL de agua hasta un volumen final de disolución de 250 mL.

- h) Disolución de N-1-naftiletilendiamina dihidroclórica 0.4 M (Disolución III): Se pesan del orden de 0.1 g de de N-1-naftiletilendiamina dihidroclórica y se disuelven en ultrasonidos en de 100 mL de agua.
- i) Disolución madre de nitrito de sodio 0.25 M: Se pesan del orden de 3 g de nitrito sódico y se secan en estufa a 110 °C hasta peso constante. Seguidamente se pesan 0.0174 g y se disuelven en 100 mL de agua.
- j) Disolución de trabajo de nitrito de sodio: Se disuelven 5 mL de la disolución stock de nitrito sódico y 10 mL de la disolución tampón en un volumen final de 500 mL de agua, resultando una concentración final de $1.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- k) Disolución madre de nitrato de potasio 1.80 M: Se pesan del orden de 3 g de nitrito potásico y se secan en estufa a 110 °C hasta peso constante. Seguidamente se pesan 0.1534 g y se disuelven en 100 mL de agua.
- l) Disolución de trabajo de nitrato de potasio: Se disuelven 2.5 mL de la disolución stock de nitrito potásico y 10 mL de la disolución tampón en un volumen final de 500 mL de agua, resultando una concentración final de $4.70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- m) Disolución tampón, pH 9.6 a 9.7 para la determinación de nitratos y nitritos: Se disuelven 50 mL de HCl concentrado en 600 mL de agua Milli-Q. A continuación se añaden 135 mL de amoniaco concentrado y se ajusta el pH bien con HCl o con NH_3 para llegar a un pH final comprendido entre 9.6 y 9.7. Se enrasa a un volumen final de disolución de 1 L con agua Milli-Q.
- n) Disolución de ácido bórico del 2 %: Se disuelven 10 g de ácido bórico en unos 100 mL de agua destilada. A continuación, se pasan a un matraz de 500 mL y se lleva hasta el enrase con agua destilada.
- o) Disolución indicadora para valoraciones en Kjeldhal: Se mezclan 2 volúmenes de disolución de rojo de metilo al 0.2 % en etanol del 95 % con 1 volumen de disolución de azul de metileno al 0.2 % en etanol. La mezcla se prepara en el momento.
- p) Disolución patrón de ácido sulfúrico 0.03 M para digestión Kjeldhal: Se diluye 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (peso específico 1.84 g/cm^3) a un volumen final de 1 L, con agua destilada. Posteriormente se valora con carbonato sódico.

▪ **Disoluciones auxiliares**

- HCl 0.01, 0.1, 1 y 3 M.
- Ácido acético 0.01, 0.1, 1 y 3 M.
- Hidróxido sódico al 40%.
- Hidróxido sódico 0.1 y 1 M.
- Disolución acuosa de hidróxido sódico al 1%.

1.2.5. MUESTRAS

- Formulación comercial SIROFOP®. Líquido concentrado emulsionable que contiene un 36% p/v de Diclofop-Metil, suministrado por Proplant Protection Company S.L (Madrid, España). SIROFOP® es un herbicida comercial post-emergencia utilizado para el control de avena silvestre, mijo silvestre, y otras malezas anuales en cultivos de trigo, cebada, remolacha. Dicha formulación contiene diclofop-metil en una matriz compleja formada por un disolvente orgánico (no especificada por el fabricante) y un líquido emulsionable. La muestra se conserva en lugar seco y a temperatura ambiente
- Suelo de elevado contenido orgánico: El muestreo se ha realizado en una superficie de suelo no tratado con herbicidas y despoblado de vegetación de 20 x 30 cm y una profundidad 3 cm ($\approx 40 \text{ Kg m}^{-2}$ de tierra). Las muestras recogidas se han conservado y almacenado en el laboratorio a temperatura ambiente.
- Alimentos listos para el consumo sometidos a radiaciones ionizantes en dosis comprendidas entre 1-8 kGy: Se escogieron diferentes tipos de alimentos RTE: jamón cocido bajo en grasa en lonchas marca Casademont (fiambres cárnicos sometidos a nitrificación y cocción), hamburguesas mezcla de carne de vacuno y de cerdo con contenido sal $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (carne fresca finamente dividida) jamón serrano paleta ibérica en lonchas (producto cárnico madurado), queso blando en lonchas tipo sándwich marca Larsa (producto sometido a un proceso de fermentación) y salmón noruego ahumado en lonchas (producto sometido a un tratamiento térmico de ahumado). Todas las muestras se conservaron a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 24 horas antes de su uso se mantuvieron refrigeradas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Chocolates de distinto contenido en cacao: En el estudio realizado se utilizaron tabletas de chocolate marca Lindt de elevado contenido en cacao (70, 85 y 99%) y bajo contenido en azúcares. Además se ensayaron muestras de cacao puro marca Valor y natural ecológico de Intermón Oxfam.

2. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS

La separación y determinación de este tipo de herbicidas se ha llevado a cabo mediante **cromatografía de líquidos** utilizando **columnas convencionales de HPLC** y una **fase estacionaria quiral de α_1 -glicoproteína**. La detección se ha efectuado a una longitud de onda de 230 nm y a 307 nm en el caso del mefenpyr-dietil. La identificación de cada uno de los herbicidas, se ha realizado por comparación de sus tiempos de retención con los obtenidos para cada compuesto por separado, y en algunos casos, por enriquecimiento de las disoluciones inyectadas.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LOS HERBICIDAS DICLOFOP-ÁCIDO, DICLOFOP-METIL, QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL

Se realizaron diversos ensayos preliminares en una columna quiral de α_1 -glicoproteína ácida (AGP-CHIRALTM, 100x3.00 mm) evaluándose la influencia de la concentración de tampón fosfato (5, 10, 30, 40, 70, 80 y 100 mM), el pH (4, 6, 6.5 y 7), la proporción de 2-propanol (0.5, 1, 1.5, 5, 10, 15 y 20 %) de la fase móvil y la temperatura de trabajo tanto en la resolución de los enantiómeros como en el tiempo de retención de los mismos. Tras la evaluación preliminar se realizan diferentes diseños experimentales para optimizar la separación de los enantiómeros.

La separación se realiza sobre una disolución que contiene 5 mg·L⁻¹ del racemato del herbicida objeto de estudio preparada a partir de la disolución patrón y enrasando a 10 mL con la fase móvil correspondiente en cada caso, utilizando el

cromatógrafo de líquidos marca Beckman descrito en el apartado 1.1.1 e inyectando volúmenes de disolución de 20.0 μL , fijando el caudal a 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

a) Diclofop-ácido

Se aplicó un diseño experimental completo de tres niveles y tres factores ($3^k = 3^3$) con un total de 27 experimentos con los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

1. Concentraciones de tampón fosfato: 40 mM, 70 mM, 100 mM.
2. pH del tampón: 6.0, 6.5, 7.0.
3. Porcentaje de 2-propanol de la fase móvil: 0.50%, 1.0%, 1.5%.

b) Diclofop-metil

Se realizó un diseño compuesto centrado de tres niveles y tres factores con un total de 15 experimentos ($2^k + 2 \cdot k + C$, siendo C el número de réplicas del punto central), estableciendo los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

1. Concentraciones de tampón fosfato: 30 mM, 40 mM, 50 mM.
2. pH del tampón: 6.0, 6.5, 7.0.
3. Porcentaje de 2-propanol de la fase móvil: 9%, 13%, 17%.

c) Quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil

La optimización se llevó a cabo fijando la concentración de tampón fosfato a 10 mM y realizando un diseño experimental personalizado con un total de 20 experimentos en el que se han establecido los siguientes niveles:

1. pH del tampón: 6.5 y 7.0.
2. Porcentaje de 2-propanol en la fase móvil: 5%, 7.5% y 10%.
3. Temperatura de la columna y de la fase móvil: 10 °C, 15 °C y 20 °C.

En este caso la separación se realizó utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Jasco (sistema 1) descrito en el apartado 1.1.2.

Las ecuaciones del calibrado ($n=8$) se han obtenido en el intervalo de concentración 0.150-50 mg L^{-1} y 0.300-50.0 mg L^{-1} para los enantiómeros del diclofop-ácido y diclofop-metil respectivamente, 0.625-40.0 mg L^{-1} para los del fluazifop-butil, y 0.250-40.0 mg L^{-1} y 0.125-40.0 mg L^{-1} en el caso del quizalofop-etil y mefenpyr-dietil.

La reproducibilidad de los métodos analíticos se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los herbicidas de 12 mg L⁻¹ (n=5), a través de la medida de la resolución enantiomérica y el tiempo de retención corregido del segundo enantiómero.

2.1.1. DECONVOLUCIÓN E INTEGRACIÓN DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DE LOS ENANTIÓMEROS

La deconvolución e integración de los picos cromatográficos de cada enantiómero del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, se llevó a cabo mediante el paquete informático PeakFit versión 4.12, utilizando una función Gaussiana exponencialmente modificada (EMG):

$$Eq. [7] \quad y = \frac{a_0}{2a_3} \exp\left(\frac{a_2^2}{2a_3^2} + \frac{a_1 - x}{a_3}\right) \left[\operatorname{erf}\left(\frac{x - a_1}{\sqrt{2}a_2} - \frac{a_2}{\sqrt{2}a_3}\right) + \frac{a_3}{|a_3|} \right]$$

Los cromatogramas obtenidos en los diseños experimentales de cada uno de los herbicidas anteriormente mencionados se convierten a formato ASCII (.txt), introduciéndolos en la herramienta informática y seleccionando únicamente la parte correspondiente a los picos de los enantiómeros para poder trazar así la línea base. Tras aplicar el modelo matemático EMG se integran los picos deconvolucionados, estimándose las áreas, anchuras y tiempos de retención de cada uno de ellos y calcular la relación enantiomérica (ER) y la fracción enantiomérica (EF) según las ecuaciones 5 y 6.

2.1.2. ANÁLISIS DE QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL EN MUESTRAS DE SUELO.

- **Caracterización de las propiedades físico químicas del suelo muestreado**

a) Análisis granulométrico del suelo

La caracterización granulométrica del suelo se llevó a cabo según la norma ISO 11508 (427). Se desmenuza una porción homogénea de muestra y se deja secar. Se toman aproximadamente 10 g de muestra seca y se somete a la separación de sus

partículas por tamaños mediante un juego de tamices normalizado de tamaño de poro de 50 μm , 25 μm y < 25 μm respectivamente.

b) Determinación del pH

Se pesan 10 g de muestra en un frasco de PTEF de 100 mL de capacidad, se añade 25 mL de agua milli-Q y se agita 10 minutos mediante un agitador mecánico. La muestra se deja reposar durante 30 minutos, para después medir el pH de la suspensión formada (428).

c) Determinación de la conductividad

El mismo extracto acuoso preparado para la determinación del pH, se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm y se mide la conductividad a 20 °C del líquido sobrenadante (428).

d) Determinación de la humedad

Se toman 2 g de suelo tamizados a un tamaño máximo de partícula de 2 mm y se colocan en una cápsula de porcelana previamente tarada. La muestra se deja en estufa a 105 °C durante 24 horas para posteriormente determinar la humedad por pérdida de peso (428).

e) Determinación del contenido en materia orgánica

La misma muestra utilizada en la determinación de la humedad se pasa a un horno mufla a 430 °C y se deja durante 24 horas. La materia orgánica se determinó mediante pérdida de peso. Antes de realizar las pesadas las muestras se dejan en desecador, para que alcancen la temperatura ambiente sin absorber humedad (428).

f) Determinación de la densidad

La densidad del suelo muestreado se determinó mediante pesada directa de la masa de suelo seco tamizado a un tamaño máximo de partícula de 2 mm que ocupaba un volumen de 10 cm^3 de suelo (427).

▪ **Análisis quiral del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en suelos**

El suelo muestreado se tritura en un mortero de mármol y se deja secar al aire durante 24 horas a temperatura ambiente, se pasa por el tamiz para desechar las partículas de más de 2 mm. La muestra se almacena a temperatura ambiente hasta su análisis (283).

Muestras de suelo de aproximadamente 1 g se enriquecieron con mefenpyr-dietil en forma racémica en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.50–2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$, mientras que el fluazifop-butil y el quizalofop-etil fueron añadidos en distintas proporciones enantioméricas en el intervalo de concentraciones de 2.5–9.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 1–9.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Los niveles de adición se escogieron en función de las dosis habituales de aplicación de dichos herbicidas y las dosis residuales esperadas en suelos.

Las muestras se estabilizaron durante 30 minutos en la oscuridad hasta conseguir la evaporación total del disolvente y el equilibrado de la muestra y se sometieron a tres extracciones consecutivas de 5 minutos en baño de ultrasonidos utilizando acetona en el caso del quizalofop-etil y acetonitrilo acidificado con 1 % de ácido acético para el fluazifop-butil y mefenpyr-dietil. Los extractos líquidos se separan de los sólidos mediante centrifugación durante 10 minutos a 4200 rpm y se recogen en un tubo de centrifuga llevándose a sequedad a vacío bajo corriente de nitrógeno. Se reconstituye con 0.5 mL de la fase móvil correspondiente en cada caso y se analizan 20 μL utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Jasco descrito en el apartado 1.1.2, inyectando volúmenes de disolución de 20.0 μL .

Las ecuaciones del calibrado ($n=5$) se han obtenido en el intervalo de concentraciones de 0.20–1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el caso de los enantiómeros del mefenpyr-dietil y entre 2–7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.4–2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los del fluazifop-butil y quizalofop-etil respectivamente.

2.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA QUIRAL SIMULTANEA UNIDIMENSIONAL DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL.

Se lleva a cabo un estudio de separación en gradiente utilizando las fases móviles optimizadas para cada herbicida por separado (ver sección 2.1) y la columna quiral de α_1 -glicoproteína ácida. Se evalúan distintos programas de gradiente en los cuales se variaba el tiempo de cambio de la composición de la fase móvil y el tiempo de estabilización a la nueva fase, escogiendo finalmente un gradiente en un solo paso en el que, al minuto 14, la fase móvil correspondiente a la separación quiral del diclofop-ácido se cambia por la fase móvil óptima de la separación enantiomérica del diclofop-metil.

En todos los casos la separación de los enantiómeros se realiza sobre una disolución que contiene $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del racemato de cada uno de los herbicidas. Las muestras se preparan diariamente a partir de las disoluciones patrón y enrasando a 10 mL con la fase móvil utilizada en cada caso, fijando 230 nm como longitud de onda de detección, utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Beckman descrito en el apartado 1.1.1 e inyectando volúmenes de disolución de $20.0 \mu\text{L}$.

Los calibrados ($n=7$) se han obtenido en el intervalo de concentraciones de $0.25\text{-}50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para los enantiómeros del diclofop-ácido y $0.50\text{-}50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para los del diclofop-metil. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los herbicidas de $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$), a través de la medida de la relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF).

2.1.4. ANÁLISIS SIMULTÁNEO UNIDIMENSIONAL DE DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL EN MUESTRAS DE SIROFOP®

Utilizando las condiciones del gradiente en un solo paso especificadas en el apartado 2.1.3., se analizan muestras de la formulación comercial SIROFOP®. El producto comercial concentrado se diluye 1/100 con metanol y la disolución resultante se homogeniza en baño de ultrasonidos.

A partir de esta disolución madre, por dilución 1/20 con metanol, se prepara otra disolución intermedia de la que se toman distintos volúmenes y se llevan a 5 mL de la fase móvil correspondiente, con posterior tratamiento en baño de ultrasonidos. El

análisis se realiza fijando 230 nm como longitud de onda detección, utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Beckman descrito en el apartado 1.1.1 e inyectando volúmenes de disolución de 20.0 μL . En todos los casos, durante la inyección de la muestra, ésta se pasa por un filtro de jeringa de nailon de 0.45 μm de tamaño de poro.

Nuevamente, los cromatogramas obtenidos se convierten a formato ASCII (.txt), introduciéndolos en la herramienta informática de deconvolución de señales. Tras aplicar el modelo matemático EMG se integran los picos deconvolucionados, estimándose las áreas, anchuras y tiempos de retención de cada uno de ellos y calcular la relación enantiomérica (ER) y la fracción enantiométrica (EF) según las ecuaciones 5 y 6.

2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL MEDIANTE ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL HPLC aquiral-HPLC quiral

2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PRIMARIA DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL.

Se realizaron diversos ensayos preliminares en una columna C_{18} (C_{18} - LUNA, 150 x 4.60 mm) utilizando distintas fases móviles en las que se fija la concentración de tampón fosfato (30mM) y se varia la proporción de metanol (70 y 80 %) y el pH (4, 6 y 7). Seguidamente se realiza un diseño experimental completo de dos factores y tres niveles (3^2) con un total de 9 experimentos, estableciendo los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

1. pH del tampón: 6.0, 6.5, 7.0.
2. Porcentaje de MeOH de la fase móvil: 70%, 75%, 80%.

La separación cromatográfica se realizó sobre disoluciones patrón que contienen $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del racemato de cada uno de los herbicidas estudiados, a partir de las disoluciones madre y enrasando a 10 mL con la fase móvil correspondiente. Se fijó 230 nm como longitud de onda detección, utilizando el cromatógrafo de líquidos (sistema 2) descrito en el apartado 1.1.2 e inyectando volúmenes de disolución de 20.0 μL .

Las curvas de calibrado ($n=7$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de $0.25-5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $5-150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso del diclofop-ácido y para el diclofop-metil entre $5-150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los herbicidas de 20 mg L^{-1} ($n=3$), a través de la medida de la diferencia de tiempos de retención de los dos herbicidas y del tiempo de retención corregido del diclofop-metil.

2.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL HPLC aquiral-HPLC quiral

Mediante una válvula de inyección situada entre la bomba 2 y la válvula de transferencia (figura 18) se inyectan $20 \mu\text{L}$ de disolución patrón de $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del racemato. La señal cromatográfica se monitoriza mediante el detector acoplado a la salida de la columna C_{18} (sistema 2 descrito en la sección 1.1.2) transfiriéndose una porción de pico al sistema cromatográfico acoplado que contiene la columna quiral (paso 2 de la figura 18) donde se lleva a cabo la separación quiral (sistema 1 descrito en la sección 1.1.2). Tras la transferencia de la porción de pico, la válvula de desplazamiento retorna a la posición 2 (figura 18) hasta que el segundo racemato es monitorizado en el cromatógrafo donde se realiza la separación aquiral, volviendo a repetirse el proceso de transferencia de una porción de este nuevo pico. Se optimizan los tiempos de transferencia de disoluciones de diclofop-ácido y diclofop-metil tanto por separado como en mezclas de ambos.

Las curvas de calibrado ($n=6$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de $5-75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $10-75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso de los enantiómeros del diclofop-ácido y del diclofop-metil respectivamente. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los herbicidas de 20 mg L^{-1} ($n=3$), a través de la medida de la relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF).

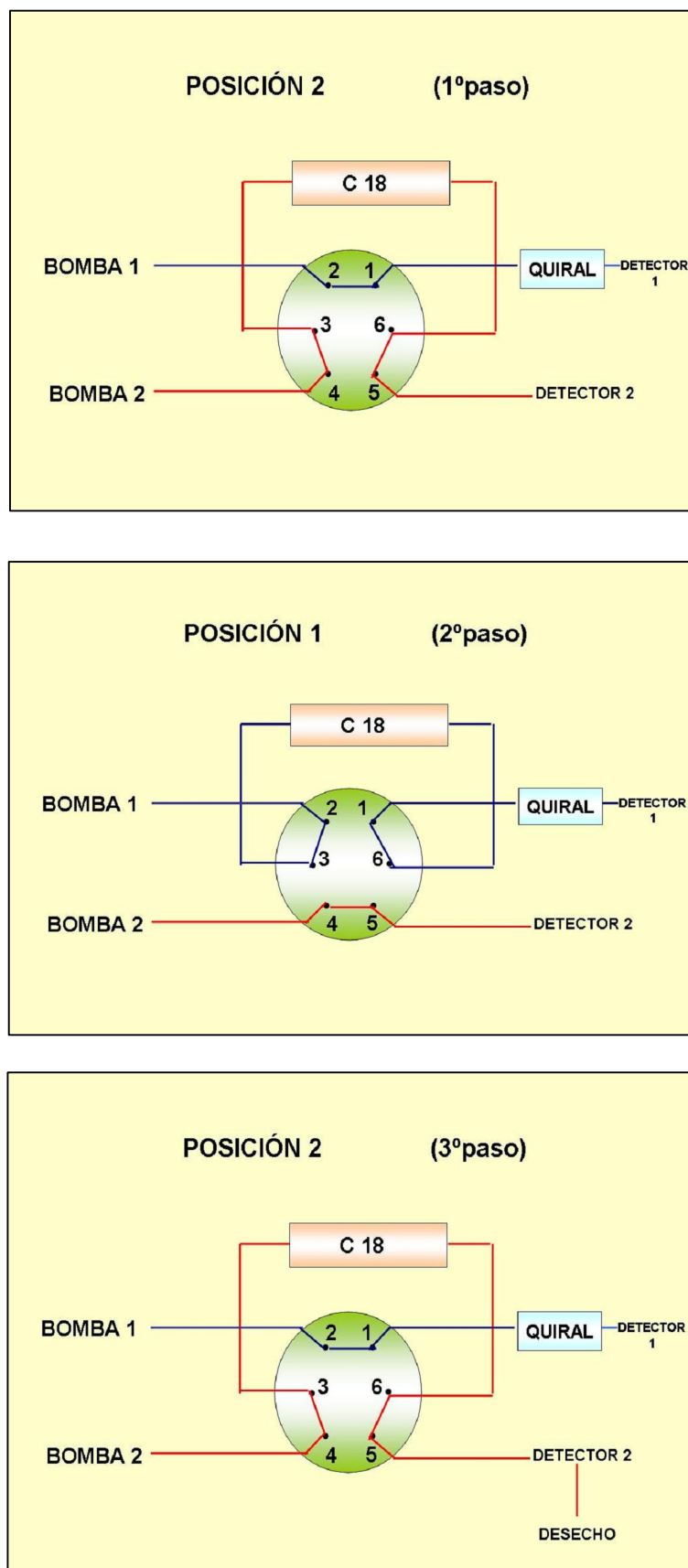


Figura 18. Esquema del dispositivo del acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral.

2.2.3. ANÁLISIS DE DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL EN MUESTRAS DE SIROFOP® MEDIANTE LC-LC-UV

- **Análisis de la composición del cuantitativa del producto comercial**

El análisis y cuantificación de los racémicos del diclofop-ácido y diclofop-metil en las muestras de SIROFOP® se lleva a cabo mediante la separación cromatográfica primaria (apartado 2.2.1.) diluyendo 0.25 mL de la disolución de trabajo del preparado comercial especificada en la sección 2.1.4., en 10 mL de la fase móvil correspondiente, con posterior tratamiento en baño de ultrasonidos. Se fijó 230 nm como longitud de onda de detección, utilizando el cromatógrafo de líquidos (sistema 2) descrito en el apartado 1.1.2 e inyectando volúmenes de disolución de 20.0 µL

- **Análisis quiral del producto comercial**

Mediante el acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2 se determina la composición quiral del diclofop-ácido y diclofop-metil en el preparado comercial SIROFOP®. Para ello se toman 3 mL de disolución de trabajo y se llevan a 25 mL con la fase móvil correspondiente, con posterior tratamiento en baño de ultrasonidos. Un volumen de 20 µL de dichas muestras, se inyectan en el sistema 2 del acoplamiento bidimensional descrito en la sección 1.1.2., transfiriendo distintas fracciones del pico cromatográfico de cada herbicida al sistema 1, en el cual los enantiómeros se separan bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.

3. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y COMPUESTOS DERIVADOS

3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LA SEROTONINA Y SUS PRECURSORES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se realizan diversos ensayos utilizando distintas columnas cromatográficas y distintas fases móviles en las que se varía la naturaleza de modificador orgánico y su proporción y la disolución reguladora, con el fin de estimar los tiempos de retención de serotonina y sus precursores L-triptófano y 5-hidroxi-triptófano. La determinación mediante cromatografía líquida capilar de estos analitos se lleva a cabo mediante elución en gradiente con una fase móvil compuesta por formiato amónico (disolución A) y acetonitrilo (B) a un caudal de $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ y a una temperatura de 25°C según el programa que se muestra en la tabla 19.

La respuesta del detector ESI-MS se optimiza para obtener el área y anchura de pico más adecuadas. Se utiliza un diseño experimental de 48 experimentos estableciendo los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

1. Concentraciones de tampón formiato: 5 mM, 12.5 mM, 20 mM.
2. pH del tampón: 4 y 6.
3. Volúmen de inyección: 5 μL , 10 μL , 20 μL .
4. Disolución de focalización: inyección en disolución reguladora o en agua milli-Q.

La separación se realiza sobre disoluciones que contenían $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cada analito preparada a partir de la disolución patrón y enrasando a 5 mL con la disolución de focalización requerida en cada caso, utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Agilent descrito en el apartado 1.1.3 y el gradiente especificado en la tabla 19.

Tabla 19. Gradiente utilizado en la separación cromatográfica de la serotonina y sus precursores

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)
0	3
2	3
3	7
8	7
10	3
12	3

Las condiciones óptimas de separación de los compuestos anteriormente enumerados objeto de estudio se establecieron mediante análisis multirespuesta. La

identificación de cada uno de los analitos, se ha realizado mediante el ión molecular $[M+1]^+$ y los fragmentos característicos $[M+1-17]^+$ y $[M+1-23]^+$.

Las curvas de calibrado ($n=9$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de $3-500 \mu\text{g L}^{-1}$ para el 5-OH-Trp y la serotonina, mientras que en el caso del triptófano, el calibrado se ha realizado ($n=12$) en el intervalo de concentraciones de $0.25-500 \mu\text{g L}^{-1}$. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los analitos de 5, 50 y $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=5$), a través del área y anchura de pico y tiempo de retención.

3.2. DETERMINACIÓN DE SEROTONINA, L-TRIPTÓFANO Y 5-HIDROXI-TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE

3.2.1. EXTRACCIÓN DE LA SEROTONINA, L-TRIPTÓFANO Y 5-HIDROXI-TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE

Las muestras se trituran y dividen finamente con la ayuda de un cuchillo de laboratorio y un rallador. Una porción de muestra de 10 g de chocolate se somete a cuarteo (429). La muestra finamente dividida se coloca en una superficie plana, limpia y que no absorba la humedad del alimento (plato de porcelana) y con la ayuda de una espátula se amontona para, posteriormente, dividir la muestra en cuatro partes iguales de las cuales dos partes opuestas son descartadas y las otras dos se mantienen para repetir el procedimiento tantas veces como sea necesario para alcanzar la cantidad de muestra adecuada para el análisis.

Se pesa 1 g, y se somete a dos extracciones sucesivas con 5 mL de éter de petróleo mediante agitación mecánica durante 10 minutos con el fin de extraer completamente las grasas presentes en el chocolate. El extracto orgánico se separa del chocolate mediante centrifugación durante 10 minutos a 4200 rpm. Los restos de éter se eliminan mediante una corriente de nitrógeno. Al residuo seco resultante se añaden 5 mL de ácido fórmico 0.2 M y se dejan en baño de ultrasonidos durante 20 min. El sólido se separa del extracto líquido mediante centrifugación durante 45 minutos a 4200 rpm.

3.2.2. ANÁLISIS DE SEROTONINA Y SUS PRECURSORES EN MUESTRAS DE CHOCOLATE CON DISTINTO CONTENIDO EN CACAO

Se toman 50 μL del extracto obtenido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1. y se pasan a través de un filtro de jeringa de PTEF de 0.2 μm de tamaño de poro llevándose a un volumen final de 1 mL con agua milli-Q con fines de focalización y posterior tratamiento en baño de ultrasonidos. Las muestras se analizan utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Agilent descrito en el apartado 1.1.3 e inyectando volúmenes de disolución de 10.0 μL . y bajo el gradiente y las condiciones especificadas en la sección 3.1.

Las ecuaciones del calibrado ($n=7$) se han obtenido en el intervalo de concentraciones de 0.5-25 $\mu\text{g g}^{-1}$ para cada uno de los analitos en cada una de las variedades de chocolate ensayadas.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO.

Para la optimización de la separación cromatográfica de los enantiómeros de la tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp) se realizan diversos ensayos preliminares de dicha separación en una columna quiral de teicoplanina (CHIROBIOTIC-T, 150 x 2.1 mm) utilizando distintas fases móviles en las que se varía la naturaleza y proporción del modificador orgánico (metanol, acetonitrilo), la naturaleza, concentración y pH de la disolución reguladora (tampón acetato amónico, agua o disolución acuosa de TEA) con el fin de estimar el tiempo de retención de los enantiómeros de cada uno de los aminoácidos, así como su enantioselectividad.

La optimización se completa mediante la realización de dos diseños experimentales con un total de 4 experimentos cada uno, estableciendo los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

1. Porcentaje de metanol de la fase móvil: 90 % y 100 %
2. pH del medio:
 - I. Sin ajuste de pH (agua) y 0.1% TEA pH=4.
 - II. Sin ajuste de pH (agua) y tampón acetato amónico 20 mM pH 7.

La separación se realizó sobre disoluciones que contenían $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-aminoácido y $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del D-aminoácido, preparadas a partir de las disoluciones patrones y enrasando a 10 mL con la fase móvil utilizada en cada caso, fijando para su detección 260 nm como longitud de onda compromiso utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Beckman descrito en el apartado 1.1.1 e inyectando volúmenes de disolución de 20.0 μL . La cuantificación de cada uno de los enantiómeros se realiza mediante calibrado externo sobre patrones.

Las curvas de calibrado ($n=10$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de 0.200-50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso de los isómeros L-y D- de la tirosina y para los de la fenilalanina y triptófano 0.300-50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0.100-50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de 10 mg L^{-1} del L-enantiómero y 5 mg L^{-1} del D-enantiómero cada uno de los aminoácidos ($n=5$), a través de la medida de la enantioresolución y enantioselectividad.

3.4. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL DE LA TIROSINA FENILALANINA Y TRIPTÓFANO MEDIANTE ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL HPLC aquiral-HPLC quiral

3.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PRIMARIA DE LOS AMINOÁCIDOS

Para la optimización de la separación cromatográfica en fase inversa de la tirosina, o-tirosina, *m*-tirosina, fenilalanina, triptófano y 5-hidroxitriptófano se evalúan los siguientes factores:

1. Columna cromatográfica: C₁₈-LUNA, DISCOVERY-C₁₆-amida, ATLANTIS-dC₁₈, Kinetex™ HILIC.
2. Concentración de tampón acetato amónico: 0.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM.
3. pH del tampón: 4.0, 5.5, 6.0 y 6.5.
4. Porcentaje de MeOH en la fase móvil: 3-90%.
5. Porcentaje de AcN en la fase móvil: 50-95%.

La separación cromatográfica en fase inversa se realizó sobre muestras que contenían $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los aminoácidos estudiados, preparadas a partir de las disoluciones patrón y enrasando a 10 mL con la correspondiente fase móvil, fijando 260 nm como longitud de onda de detección y utilizando el cromatógrafo de líquidos (sistema 2) descrito en el apartado 1.1.2 e inyectando volúmenes de disolución de $20.0 \text{ }\mu\text{L}$.

Las curvas de calibrado ($n=10$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de 0.1 y $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 25 - $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada uno de los aminoácidos objeto de estudio y sus principales productos de degradación. La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los analitos de 5 , $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=3$), a través del área de pico y tiempo de retención corregido de cada uno de los analitos.

3.4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL MEDIANTE ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO HPLC aquiral-HPLC quiral

La optimización de los tiempos de transferencia de los aminoácidos desde la dimensión aquiral a la quiral se realiza de manera similar a la descrita para los herbicidas diclofop-metil y diclofop-ácido en el apartado 2.2.2 de esta sección. La separación bidimensional quiral LC-LC de manera conjunta para los tres aminoácidos, se realizó sobre disoluciones que contienen $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada enantiómero de cada uno de los tres aminoácidos, preparadas a partir de las disoluciones patrones y enrasadas con la fase móvil optimizada para la separación cromatográfica en fase inversa.

Las curvas de calibrado ($n=10$) se obtuvieron en el intervalo de concentraciones de 4 - $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 10 - $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso de los enantiómeros del de la tirosina y fenilalanina respectivamente y entre 2 - $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso del triptófano ($n=7$). La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de enantiómeros de 20 mg L^{-1} ($n=3$), a través de la medida de la relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF).

3.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS RTE SOMETIDOS A RADIACIONES IONIZANTES

▪ Irradiación de alimentos

Se utilizan alimentos RTE en lonchas de unos 2-3 mm de espesor, excepto la carne picada, que fue dividida en porciones de uno 50 g y 1 cm de espesor. Las muestras fueron envasadas al vacío en bolsas de baja permeabilidad gaseosa y transportadas en cajas de poliestireno aisladas, para finalmente ser sometidas a un tratamiento de higienización mediante radiaciones ionizantes con una fuente de electrones acelerados de 10 Mev de potencia en la planta de higienización IONMED (Tarancón). La energía del haz aplicado, la tasa de dosis media, la relación máximo/mínimo, y la profundidad de penetración de dicho haz fueron 10 kW, 92 min·kGy⁻¹, 1.1, y 4.2 cm respectivamente. Los alimentos de cada bolsa fueron sometidos a tratamientos de radiación en dosis comprendidas entre 1-8 kGy. La dosis absorbida por las muestras fue verificada por la determinación de la absorción en dosímetros de triacetato de celulosa adjuntos a cada paquete en el momento de la irradiación de las muestras (430). El proceso de irradiación se llevó a cabo a temperatura ambiente (19 ± 1 °C), con un incremento aproximado de dicha temperatura durante el tratamiento menor de 2 °C. Tanto las bolsas que contenían las muestras sin irradiar como las irradiadas se almacenaron a -18 °C y se descongelaron a 4 °C durante 24 horas antes de su utilización.

▪ Análisis composicional de los alimentos RTE

Todas las variables composicionales que se detallan a continuación se determinaron al menos por triplicado tanto en muestras no irradiadas como irradiadas a dosis de 1, 2, 4, 6 y 8 kGy.

a) Determinación del contenido proteico

La determinación del nitrógeno total se llevó a cabo de acuerdo al método oficial AOAC 981.10 (431) efectuando ligeras modificaciones. Una cantidad de muestra pesada de 1 g se sometió a digestión en 12 mL de ácido sulfúrico concentrado en presencia de pastillas de catalizador de K₂SO₄/CuSO₄ y a una temperatura de 480 °C, hasta que la mezcla adquiere un tono transparente. Dicha

mezcla fue neutralizada con hidróxido sódico al 40%, destilada y los vapores destilados absorbidos sobre una solución acuosa de ácido bórico al 2%. El ácido bórico no neutralizado por el amoníaco destilado fue determinado mediante valoración con ácido sulfúrico 0.03 M previamente estandarizado hasta el viraje de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno empleada como indicador. El contenido proteico de cada alimento se determinó multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido en cada caso por un factor dependiente del tipo de alimento, en este caso 6.38 para productos lácteos y 6.25 para productos cárnicos y pescados.

b) Determinación de contenido en grasas

La grasa se determinó siguiendo las indicaciones de las notas de aplicación suministradas por Dionex. En el caso del queso, se empleó el procedimiento descrito en la Nota nº 345 (432) y en el caso de carnes y pescado el de la nota nº 334 (433). La muestra, de 1 g para el queso y el salmón ahumado y de 3 g para el resto de alimentos, se dispersa en tierra de diatomeas hasta formar una mezcla totalmente homogénea, la cual se introduce en las celdas de extracción de acero inoxidable del equipo de extracción acelerada con disolventes Dionex ASE 200. El disolvente utilizado en la extracción fue éter de petróleo, excepto para el queso que se empleó una mezcla de hexano/isopropanol (3:2, v/v). Durante la extracción la temperatura y la presión se fijaron en 80 °C y 138 bar respectivamente. El extracto resultante se evapora mediante un baño fijando la temperatura a unos 60 °C. Antes de realizar las pesadas, las muestras fueron colocadas en desecador. La cantidad de grasa se determinó mediante pérdida de peso.

c) Determinación de contenido en humedad

El contenido en humedad se determinó mediante el método oficial AOAC 930.15 (434). Una cantidad de 1 g de muestra se sometió a una temperatura de 135 °C durante 2 horas. Antes de realizar las pesadas, las muestras fueron colocadas en un desecador. La cantidad de agua libre se determinó mediante pérdida de peso.

d) Determinación espectrofotométrica de nitratos y nitritos

La cantidad de nitratos y nitritos en muestras se determinó según el método de referencia ISO 14673-1 (435), basado en la determinación espectrofotométrica mediante la reacción de Greiss. Se pesan en torno a 10 g de muestra y se añade 160

mL de agua milli-Q previamente calentada a una temperatura de aproximadamente 50 °C, mezclándose con la ayuda de un agitador magnético hasta obtener una suspensión. Seguidamente, con el fin de desproteinizar la muestra, se añaden por orden 6 mL de la disolución de sulfato de zinc, 6 mL de hexanocianoferrato de potasio (II) y 40 mL de solución tamponada, agitando durante 5 min después de cada adición. La disolución resultante se filtra a vacío utilizando un matraz kitasato y un embudo büchner en el que previamente se ha colocado el papel de filtro. El filtrado obtenido se recoge y se lleva a un volumen final de 200 mL con agua Milli-Q.

Para la determinación de los nitritos se toman alícuotas de 25 mL del filtrado, añadiendo agua Milli-Q hasta 60 mL ,añadiendo además por orden 6 mL de la disolución I y 5 mL de la disolución II y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Se añaden 2 mL de la disolución III y se deja reposar otros 5 min. Finalmente, se añade agua Milli-Q hasta 100 mL y se mide la absorbancia a 538 nm del complejo rojo formado por la sulfanilamida y el N-(1-naftil)-etilendiamina, en un periodo de tiempo que no debe superar los 15 minutos. Para la determinación de los nitratos, se depositan 20 mL del filtrado y 5 mL de la solución tamponada en un embudo de extracción que se utiliza como reservorio de disoluciones que se hacen pasar por la columna de cadmio cuprizado a un caudal máximo de 6 mL min⁻¹. El eluido se recoge en un matraz de 100 mL y se lava la columna con dos porciones de 15 mL de agua haciendo pasar por la misma, agua Milli-Q hasta un volumen final de 100 mL. Se toman alícuotas de 25 mL de este filtrado y se repite el mismo proceso que el efectuado para la determinación de los nitritos. El contenido de nitrato se determinó mediante diferencia entre las dos medidas.

▪ **Extracción de los aminoácidos en las muestras de alimentos**

La extracción se lleva a cabo en una cantidad de muestra homogeneizada de 2 g (1 g en el caso del jamón serrano ibérico). Las muestras se introducen en tubos de centrifuga de PTEF de 30 mL de capacidad y se someten a tres extracciones sucesivas en baño de ultrasonidos de 30 minutos cada una, las dos primeras con 2 mL de ácido ascórbico 1 mM y la última con 1 mL de dicho ácido manteniendo la temperatura por debajo de 35 °C. Después de cada etapa de extracción, los extractos líquidos se separaron de los sólidos mediante centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm. Los extractos se combinan para formar un extracto final de unos 5 mL.

El pH del extracto recogido se ajusta a 6 con una disolución de NaOH 0.1 M (o ácido acético 0.1 M para aquellas muestras que tengan un pH superior a 6). Antes de

sus análisis las muestras se filtran mediante filtros de jeringa de nailon de 0.45 μm de diámetro de poro, a excepción de las muestras de queso que se someten a dos filtraciones sucesivas, la primera mediante un filtro de jeringa de 0.45 μm de diámetro de poro y la segunda con uno de 0.20 μm , añadiendo un 6 % de metanol.

3.5.1. ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMACIONES LOS AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS IRRADIADOS MEDIANTE LC-LC-UV

- **Análisis de los aminoácidos libres tirosina, fenilalanina y triptófano y sus principales productos de degradación en alimentos irradiados**

El análisis y cuantificación de la tirosina, fenilalanina, triptófano y sus productos de degradación, *o*- y *m*- tirosina y 5-OH-triptófano, se lleva a cabo mediante la separación cromatográfica primaria (apartado 3.4.1.) inyectando 20 μL del extracto obtenido mediante el procedimiento especificado en la sección anterior, en el cromatógrafo (sistema 2) del sistema bidimensional descrito en el apartado 1.1.2.

- **Análisis de las transformaciones quirales de los aminoácidos libres en alimentos RTE**

Los análisis previos del estudio de racemización de aminoácidos sobre patrones irradiados se realizan sobre disoluciones patrón preparadas en agua con una concentración de 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del enantiómero L- de cada aminoácido, sometiéndolas a tratamiento con radiaciones ionizantes en dosis comprendidas entre 1-8 kGy. A partir de esta disolución madre, se prepararon disoluciones de cada L-aminoácido de concentración 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y se analizaron bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.3.

Mediante el acoplamiento HPLC quiral-HPLC quiral y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2 se determina la posible transformación quiral de la tirosina, fenilalanina y triptófano inyectando 20 μL del extracto obtenido en el sistema 2 del acoplamiento bidimensional descrito en la sección 1.1.2., transfiriendo distintas fracciones del pico cromatográfico de cada uno de los aminoácidos al sistema 1, en el cual los enantiómeros se separan bajo las condiciones descritas en el apartado 3.3.

A decorative background featuring several clusters of spheres. Each cluster consists of a central purple sphere surrounded by several smaller red spheres. The spheres have a glossy, 3D appearance with highlights and shadows.

Resultados y Discusión

**PARTE I: HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS
DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS
ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO, DICLOFOP-METIL,
QUIZALOFOF-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL
MEDITANTE HPCL quiral DIRECTA y ACOPLAMIENTOS
CROMATOGRÁFICOS HPLC aquiral-HPLC quiral**

Tal y como se ha reseñado en otros puntos de esta memoria, la separación y determinación de los enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos resulta una problemática de especial interés ya que aunque dichos compuestos poseen similares características físicoquímicas, su actividad y propiedades toxicológicas difieren de forma considerable. Por otra parte, estos herbicidas normalmente se aplican en forma racémica, pero dependiendo de los procesos naturales llevados a cabo por enzimas o microorganismos, o de las características físico-químicas del medio, la degradación de los mismos puede ser estereoselectiva en cierta extensión.

A continuación se tratarán de abordar diferentes estrategias para el análisis quiral tanto de varios herbicidas de la familia de los ariloxifenoxipropiónicos (diclofop-metil y su metabolito diclofop ácido, quizalofop-etil y fluazifop-butil), así como de un herbicida de tipo protector (mefenpyr-dietil) comúnmente utilizado para potenciar la acción herbicida de los anteriormente mencionados, mostrándose seguidamente los resultados obtenidos más representativos.

I.1. ENSAYOS PREVIOS

Según los datos del “Chirbase” (base de datos especializada en separaciones quirales), y de los estudios recogidos por Féliz (312), la fase estacionaria quiral más apropiada en cuanto a la resolución de los enantiómeros de algunos herbicidas fenoxipropiónicos como el diclorprop y mecoprop es del tipo α -glicoproteína, por este motivo, y debido a la similitud estructural de dichos herbicidas con la familia de los ariloxifenoxipropiónicos, se seleccionó dicha fase estacionaria para el estudio de separación enantiomérica del diclofop-ácido, diclofop-metil, quizalofop-etil, fluazifop-

butil y mefenpyr-dietl. La columna CHIRAL-AGP™ basada en α_1 -glicoproteína ácida utilizada en este estudio permite el uso de fases móviles altamente acuosas según el proveedor Chrom Tech. Dicha fase estacionaria es compatible con todo tipo de disolventes y disoluciones reguladoras en un rango de concentraciones de 0.01-0.1 M. El parámetro más crítico de operación es el pH, pudiendo trabajar en el intervalo comprendido entre 4 y 7 para evitar así la desnaturalización de la proteína y aumentar el periodo de vida útil de la columna. Las especificaciones de dicha CSP recomiendan trabajar a un caudal inferior a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ con el fin de no alcanzar altas presiones en cabeza de columna dado al diámetro interno de la columna de 3.0 mm y el tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$ de la fase estacionaria, lo que llevó a escoger como caudal del trabajo $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, al cual, la presión de trabajo no superaba los 159 bar (15.9MPa). Puesto que el sistema de detección utilizado es monocanal, con el fin de establecer la longitud de onda óptima de detección en la separación cromatográfica de los enantiómeros, se registraron los espectros de absorción en el intervalo de 200-400 nm obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 19.

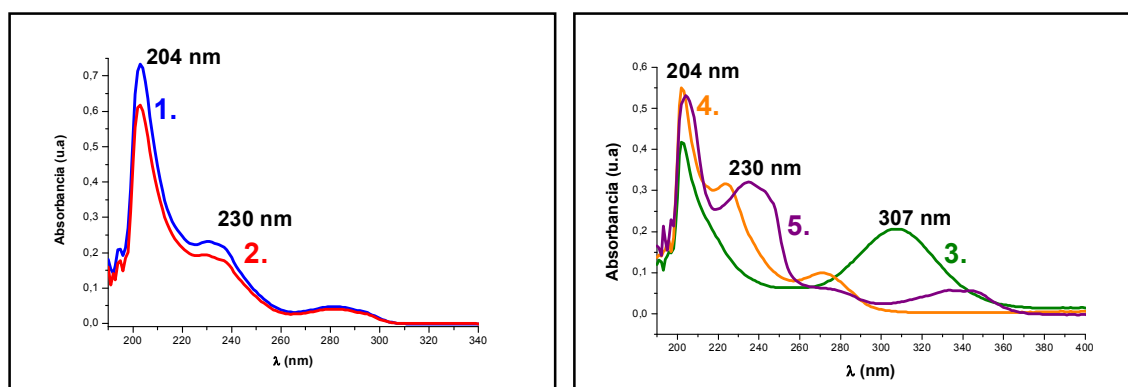


Figura 19. Espectros de absorción UV-vis obtenidos para (1) diclofop-ácido, (2) diclofop-metil, (3) mefenpyr-dietil (4) fluazifop-butil, (5) quizalofop-etil con disoluciones de los herbicidas de concentración $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en metanol.

Como se puede observar en la gráfica anterior, los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos estudiados presentan al menos dos máximos de absorción, uno en torno 204 nm y otro en torno a 230 nm, o a 307 nm en el caso del herbicida protector. Dada la dificultad de realizar medidas espectrofotométricas a longitudes de onda por debajo de 220 nm cuando se utilizan disolventes orgánicos que absorben en esa zona del espectro, se escogió como longitud de onda de trabajo 230 nm para los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y 307 nm como longitud más adecuada para la detección UV-vis en el caso del mefenpyr-dietil.

Seguidamente, y con el fin de delimitar el espacio muestral, se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares en los cuales se estudió la influencia de la composición de la fase móvil en la resolución de los enantiómeros de los herbicidas. Dada la complejidad del mecanismo de separación quiral y atendiendo a la naturaleza de los analitos, se decidió seguir la sugerencia aportada por el fabricante de la columna y comenzar los ensayos con una fase móvil de composición 2-propanol-tampón fosfato 10 mM pH 7 (5:95, v/v), para ir variando sucesivamente la concentración de tampón fosfato, el pH del mismo y la proporción de 2-propanol en la fase móvil, inyectando en el sistema cromatográfico disoluciones patrón de cada herbicida en concentración de 5 mg L⁻¹ preparadas en la fase móvil. En estas condiciones se registraron los cromatogramas correspondientes y se calculó la resolución del par de enantiómeros y el tiempo de retención corregido del segundo enantiómero según las expresiones 8 y 9:

$$Ec. [8] \quad Rs = 1.18 \frac{(tr_2 - tr_1)}{w_{1/2(1)} + w_{1/2(2)}}$$

$$Ec. [9] \quad tr_2' = tr_2 - t_0$$

Donde tr hace referencia al tiempo de retención del primer enantiómero (1) y segundo enantiómero (2) respectivamente; $w_{1/2}$ a la anchura a media altura de cada uno de ellos y t_0 al tiempo de una sustancia no retenida (tiempo básico).

En el caso del diclofop-metil los ensayos monovariantes preliminares se comenzaron con la fase móvil recomendada por el fabricante de la columna. En las sucesivas fases móviles ensayadas, se varió la concentración del tampón fosfato (40 mM, 80 mM), el pH del mismo (4, 6) y el contenido de 2-propanol (20%, 15%). Los resultados de dichos ensayos preliminares se recogen en la tabla 20.

Los resultados obtenidos muestran que:

- Manteniendo constantes la proporción del modificador orgánico y el pH, al aumentar la concentración del tampón, la resolución de los enantiómeros permanece constante, disminuyendo el tiempo de análisis.
- Manteniendo constantes la proporción del modificador orgánico y la concentración de tampón, al disminuir el pH de la fase móvil, el tiempo de análisis aumenta y se pierde la enantioseparación.

- Manteniendo constantes la concentración y el pH del tampón, al aumentar la proporción de modificador orgánico, disminuye tanto la enantioseparación como el tiempo de análisis.

Estos ensayos preliminares muestran que tanto el pH como la proporción de 2-propanol, y en mucha menor medida, la concentración del tampón, influyen tanto en la resolución de los enantiómeros del diclofop-metil como en la retención de los mismos.

Tabla 20. Resultados de los ensayos preliminares de la separación quiral del diclofop-metil

Exp.	2-propanol (%)	[Tampón] (mM)	pH	Rs	$t_{r2'}$ (min)
1	20	10	7.00	0.49	4.24
2	20	40	7.00	0.50	3.62
3	15	40	7.00	1.13	11.95
4	15	10	7.00	0.77	10.80
5	15	40	4.00	0.35	14.39
6	15	40	6.00	0.41	11.79
7	15	80	7.00	0.48	10.96

En el caso del diclofop-ácido, se siguió la misma sistemática con la diferencia de que, en este caso, la fase móvil con la que el fabricante de la columna recomienda comenzar la optimización hacía que los enantiómeros no se retuviesen en la columna. Por tanto se decidió reducir a un 1 % la cantidad de 2-propanol en la fase móvil, consiguiendo que los enantiómeros comenzaran a retenerse en la columna y se aumentó también la concentración de tampón fosfato comenzando los ensayos entonces con una fase móvil de composición 2-propanol: tampón fosfato 40 mM pH 7 (1:99, v/v). Posteriormente, se fue variando la concentración del tampón fosfato (80 mM, 100 mM), el contenido de modificador orgánico (0.5%, 1.5%) y el pH del medio (6, 6.5). Los resultados de dichos ensayos preliminares se recogen en la tabla 21. Los resultados obtenidos muestran que:

- Manteniendo constantes la proporción del modificador orgánico y el pH, al aumentar la concentración del tampón, la resolución de los enantiómeros aumenta, aumentando también el tiempo de análisis.
- Manteniendo constantes la proporción del modificador orgánico y la concentración de tampón, al disminuir el pH de la fase móvil, el tiempo de análisis aumenta y se pierde la enantioseparación, debido principalmente a que

al aproximarse el pH del medio al pKa del herbicida, las interacciones enantioselectivas de este con la columna aumentan de forma considerable.

- Manteniendo constantes la concentración y el pH del tampón, al aumentar la proporción de modificador orgánico, disminuye tanto la enantioseparación como el tiempo de análisis.

Tabla 21. Resultados de los ensayos preliminares de la separación quiral del diclofop-ácido.

Exp.	2-propanol (%)	[Tampón] (mM)	pH	Rs*	t_{r2'} (min)
1	1.0	40	7.00	0.68	5.10
2	1.0	80	7.00	0.81	6.85
3	1.0	100	7.00	1.40	9.27
4	1.0	100	6.00	0.30*	15.90
5	1.0	100	6.50	0.97	11.17
6	1.5	100	7.00	1.10	7.00
7	0.5	100	6.50	0.74	14.00
8	0.5	100	7.00	0.75	14.25

** A efectos de cálculo del modelo matemático, en aquellos casos en lo que el par de enantiómeros no esté resuelto, el valor de Rs asignado es de 0.30.*

Estos ensayos preliminares muestran que tanto el pH, como la concentración del tampón y la proporción de 2-propanol influyen en general en la resolución de los enantiómeros del diclofop-ácido y en sus tiempos de retención.

En el caso del resto de herbicidas quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, al igual que en el caso del diclofop-ácido, los estudios se comenzaron con una fase móvil de composición 2-propanol: tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (5:95 v/v). En las sucesivas fases móviles ensayadas se varió la concentración del tampón fosfato (5 mM, 10 mM y 30 mM), el contenido de modificador orgánico (5% y 10%) y el pH del tampón (6.0 y 7.0). Los resultados de dichos ensayos preliminares se recogen en la tabla 22. Los resultados obtenidos muestran que:

- Manteniendo constante la proporción del modificador orgánico y el pH, al variar la concentración del tampón, prácticamente no se ve afectada la resolución entre los enantiómeros de cada uno de los tres herbicidas.

Tabla 22. Resultados de los estudios previos de la separación quiral del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil.

Fase móvil	quizalofop-etil		fluazifop-butil		mefenpyr-dietil	
	R_s	t_{r2}' (min)	R_s	t_{r2}' (min)	R_s	t_{r2}' (min)
2-propanol:tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (5:95 v/v)	0.80	17.45	1.35	26.52	2.25	16.97
2-propanol:tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (10:90 v/v)	0.55	6.52	0.65	8.92	1.23	5.15
2-propanol:tampón fosfato 10 mM pH 6.0 (10:90 v/v)	0.41	9.22	0.48	11.00	1.21	5.50
2-propanol:tampón fosfato 30 mM pH 7.0 (10:90 v/v)	0.52	7.53	0.59	8.87	1.20	5.86
2-propanol:tampón fosfato 5 mM pH 7.0 (10:90 v/v)	0.52	7.08	0.65	9.33	1.22	5.57

- Manteniendo constante la proporción del modificador orgánico y la concentración de tampón, al disminuir el pH de la fase móvil, el tiempo de análisis aumenta y disminuye la enantioseparación en los tres herbicidas.
- Manteniendo constante la concentración y el pH del tampón, al aumentar la proporción de modificador orgánico, disminuye tanto la enantioseparación como el tiempo de análisis.

Por tanto, los ensayos monovariantes preliminares han demostrado que tanto el pH, como la proporción de 2-propanol en la fase móvil son los factores que más influyen en la resolución de los enantiómeros del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr.dietil, así como en sus tiempos de retención.

I.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN QUIRAL MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Dada la posible interacción entre los parámetros que afectan a la enantioresolución y al tiempo global de separación y con el fin de optimizar la separación cromatográfica de los enantiómeros de los herbicidas seleccionados, se hizo uso de métodos quimiométricos de diseño experimental y optimización mediante superficies de respuestas experimentales, con el fin de buscar aquellas condiciones cromatográficas que proporcionasen una resolución enantiomérica aceptable en el menor tiempo de análisis posible.

Para identificar las variables que más afectan a la separación de los enantiómeros del diclofop-ácido y evaluar sus relaciones cuadráticas, se optó por un diseño experimental completo de tres niveles y evaluación de tres variables o factores (diseño factorial 3^3), con un total de 27 experimentos (436). Los factores estudiados fueron la concentración de tampón fosfato, el pH del mismo y la proporción de 2-propanol de la fase móvil. Los niveles de variabilidad de cada factor se establecieron en función de los ensayos preliminares realizados, comprobando que los intervalos más adecuados para aplicar el diseño factorial eran:

- Proporción de 2-propanol de la fase móvil: 0.5%-1.5%.
- Concentración de tampón fosfato: 40 mM-100 mM.
- pH del tampón: 6-7.

El diseño experimental se normalizó asignando los valores -1, 0 y 1 a los niveles de cada una de las variables estudiadas y se utilizaron las condiciones cromatográficas especificadas en el apartado 2.1 de la parte experimental. La información más importante del diseño experimental así como los valores normalizados de los factores experimentales evaluados se recogen en la tabla 23. Planteado el diseño experimental se registraron los cromatogramas correspondientes a cada una de las 27 fases móviles ensayadas, integrando los picos de los herbicidas mediante el método de la "caída del valle" (VDM) propio del software de tratamiento de datos presente en el cromatógrafo, que consiste en el trazo de una línea vertical a partir del valle formado entre los dos picos hasta la línea de la base y calculando la resolución del par de enantiómeros según la Ec. [8], y el tiempo de retención corregido para el segundo enantiómero según la Ec. [9].

Tabla 23. Resultados del diseño experimental completo de tres factores tres niveles.

Exp.	2-propanol (%)		[Tampón] (mM)		pH		Rs	t_{r2}' (min)
1	0.5	-1	40	-1	6.00	-1	0.30*	18.10
2	0.5	-1	40	-1	6.50	0	0.65	10.48
3	0.5	-1	40	-1	7.00	1	1.20	8.27
4	0.5	-1	70	0	6.00	-1	0.30*	20.40
5	0.5	-1	70	0	6.50	0	0.82	11.20
6	0.5	-1	70	0	7.00	1	1.47	10.63
7	0.5	-1	100	1	6.00	-1	0.38	22.52
8	0.5	-1	100	1	6.50	0	0.86	14.52
9	0.5	-1	100	1	7.00	1	1.41	13.13
10	1.0	0	40	-1	6.00	-1	0.30*	13.13
11	1.0	0	40	-1	6.50	0	0.52	7.47
12	1.0	0	40	-1	7.00	1	0.86	6.37
13	1.0	0	70	0	6.00	-1	0.30*	13.57
14	1.0	0	70	0	6.50	0	0.68	9.58
15	1.0	0	70	0	7.00	1	1.13	7.15
16	1.0	0	100	1	6.00	-1	0.30*	13.17
17	1.0	0	100	1	6.50	0	0.67	10.20
18	1.0	0	100	1	7.00	1	1.16	9.13
19	1.5	1	40	-1	6.00	-1	0.30*	8.70
20	1.5	1	40	-1	6.50	0	0.30*	5.32
21	1.5	1	40	-1	7.00	1	0.58	4.17
22	1.5	1	70	0	6.00	-1	0.30*	11.13
23	1.5	1	70	0	6.50	0	0.40	7.00
24	1.5	1	70	0	7.00	1	0.83	6.05
25	1.5	1	100	1	6.00	-1	0.30*	12.03
26	1.5	1	100	1	6.50	0	0.50	8.37
27	1.5	1	100	1	7.00	1	0.88	6.87

* A efectos de cálculo del modelo matemático, en aquellos casos en lo que el par de enantiómeros no esté resuelto, el valor de Rs asignado es de 0.30.

En el caso del diclofop-metil con el fin de reducir el número de experimentos manteniendo el máximo de información, se optó esta vez por un diseño compuesto centrado con una réplica en el centro y tres factores con un total de 15 experimentos

(436). Los factores estudiados fueron de igual manera, la concentración de tampón fosfato, el pH del mismo y la proporción de 2-propanol de la fase móvil. En este caso, los intervalos de variación de cada factor fueron:

- Proporción de 2-propanol de la fase móvil: 9%-17%.
- Concentración de tampón fosfato: 30 mM-50 mM.
- pH del tampón: 6.0-7.0.

Como en el caso del diclofop-ácido, planteado el diseño experimental se registraron los cromatogramas correspondientes a cada una de las 15 fases móviles ensayadas, integrando los picos de los enantiómeros del herbicida mediante el método VDM, calculando la resolución del par de enantiómeros según la Eq. [8], y el tiempo de retención corregido para el segundo enantiómero según la Eq. [9]. Los valores calculados se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados del diseño compuesto centrado de tres niveles, tres factores.

Exp.	2-propanol (%)		[Tampón] (mM)		pH		Rs	t_{r2}' (min)
1	13	0	50	1	6.50	0	0.77	16.07
2	13	0	30	-1	6.50	0	0.71	16.00
3	17	1	40	0	6.50	0	0.30*	9.97
4	9	-1	40	0	6.50	0	1.17	30.30
5	13	0	40	0	7.00	1	0.80	15.99
6	13	0	40	0	6.00	-1	0.60	16.87
7	17	1	50	1	7.00	1	0.30*	12.32
8	17	1	50	1	6.00	-1	0.30*	9.97
9	9	-1	50	1	7.00	1	1.13	30.72
10	9	-1	50	1	6.00	-1	1.00	30.89
11	17	1	30	-1	7.00	1	0.30*	10.82
12	17	1	30	-1	6.00	-1	0.35	9.70
13	9	-1	30	-1	7.00	1	1.20	25.55
14	9	-1	30	-1	6.00	-1	0.94	26.24
15	13	0	40	0	6.50	0	0.78	19.10

* A efectos de cálculo del modelo matemático, en aquellos casos en lo que el par de enantiómeros no esté resuelto, el valor de Rs asignado es de 0.30.

Un procedimiento similar se utilizó para optimizar la separación cromatográfica quiral de los enantiómeros del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil. Para estos herbicidas se optó por un diseño experimental de tres niveles para el porcentaje de 2-propanol y la temperatura y de dos niveles para el pH con un total de 20 experimentos. La temperatura se incluyó en el modelo ya que otros autores habían observado previamente su influencia en la enantioresolución de estos herbicidas (330). Con respecto al pH únicamente se decidió incluir en el estudio dos niveles, ya que los experimentos previos a pH 6, en general, proporcionaban picos sin resolver. Tras los estudios preliminares en los que se pudo comprobar que la concentración del tampón fosfato apenas influía en la enantioresolución, se decidió realizar todos los experimentos manteniendo constante la concentración de tampón fosfato en 10 mM, mientras que los tres factores indicados anteriormente se variaron en los siguientes intervalos:

- Proporción de 2-propanol en la fase móvil: 5 -10 %.
- pH del tampón fosfato 10 mM: 6.5 y 7.0.
- temperatura de la columna y de la fase móvil: 15-20 °C.

Como en los casos anteriores, el diseño experimental se normalizó asignando los valores -1, 0 y 1 a los niveles de las variables estudiadas y se registraron los cromatogramas. La información más importante del diseño experimental así como los valores normalizados de los factores experimentales evaluados y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 25. Mediante los resultados obtenidos en los experimentos de cada uno de los diseños experimentales planteados, se pudieron obtener las ecuaciones que definen las superficies de respuesta experimental y que permiten predecir el comportamiento del sistema en cualquier otra condición, siempre dentro del intervalo estudiado para cada factor. El análisis de los diseños se realizó mediante el programa estadístico **STATGRAPHICS PLUS Versión 5.0**. Así, la variación de la resolución cromatográfica de los enantiómeros y del tiempo de retención corregido del segundo enantiómero de cada uno de los herbicidas en función de los factores estudiados, se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo grado del siguiente tipo para el diclofop-ácido y diclofop-metil, donde y es la variable dependiente y x_1 - x_3 las independientes:

Ec. [10]

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3 + a_7x_1^2 + a_8x_2^2 + a_9x_3^2$$

Dónde:

x_1 = proporción de 2-propanol en la fase móvil.

x_2 = Concentración del tampón fosfato.

x_3 = pH del tampón fosfato.

y = resolución enantiomérica o tiempo de retención corregido del segundo enantiómero.

Este tipo de diseños, gracias a la existencia de términos cuadráticos y de interacción, permiten la evaluación de la curvatura y el punto crítico de la superficie que genera la ecuación y la interacción entre los factores evaluados.

Y de la siguiente forma para el quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil:

Ec. [11]

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + a_6x_2x_3 + a_7x_1^2 + a_9x_3^2$$

Dónde:

x_1 = proporción de 2-propanol en la fase móvil.

x_2 = pH del tampón fosfato 10 mM

x_3 = temperatura de la columna y de la fase móvil.

y = resolución enantiomérica o tiempo de retención corregido del segundo enantiómero.

En la tabla 26, se muestran los valores de los coeficientes experimentales obtenidos (a_0 - a_9) en los ajustes realizados para cada uno de los herbicidas, así como los coeficientes de correlación múltiple (R^2) de los modelos, los valores de probabilidad (valores-P) y los errores de estimación estándar (SEE). A la vista de estos resultados, se observa que los valores del coeficiente de correlación múltiple (R^2) obtenidos indican que los modelos matemáticos explican entre el 90.2 % y el 99.9% de la variabilidad en las respuestas estudiadas. El error de estimación estándar (SEE), es un parámetro de calidad del ajuste que indica la desviación con respecto a los residuales. En este caso, los valores obtenidos en los modelos se encuentran entre 0.04-0.99, lo que indica la fiabilidad de las ecuaciones. Los valores de probabilidad (valores-P) calculados a un nivel de confianza del 95 % con un valor menor a 0.05 mostrados en cursiva y en negrita en la tabla 26, indican los factores experimentales que afectan de manera significativa a las respuestas.

Tabla 25. Parámetros cromatográficos obtenidos a partir del diseño experimental personalizado realizado para los herbicidas seleccionados.

Exp	2-propanol (%)		pH tampón 10mM		T (°C)		fluazifop-butil		quizalofop-etil		mefenpyr-dietil	
							R_s	t_{r2}' (min)	R_s	t_{r2}' (min)	R_s	t_{r2}' (min)
1	10	1	7.00	1	15	-1	0.67	13.2	0.41	9.43	0.89	7.05
2	10	1	7.00	1	20	0	0.60	11.4	0.36	8.44	0.89	6.35
3	5.0	-1	6.50	-1	15	-1	1.49	40.0	0.60	24.5	1.87	21.8
4	7.5	0	6.50	-1	15	-1	1.18	22.9	0.44	15.4	1.95	12.0
5	5.0	-1	6.50	-1	25	1	1.17	30.9	0.67	19.9	1.89	18.3
6	5.0	-1	7.00	1	25	1	1.23	28.6	0.74	18.2	1.91	17.9
7	10	1	6.50	-1	20	0	0.64	10.8	0.30	8.03	0.86	6.03
8	10	1	7.00	1	25	1	0.54	10.2	0.36	7.62	0.80	5.77
9	10	1	6.50	-1	15	-1	0.70	12.1	0.30	8.83	0.87	6.50
10	7.5	0	7.00	1	15	-1	1.04	20.2	0.54	13.4	1.32	11.1
11	7.5	0	6.50	-1	25	1	0.78	16.4	0.46	11.6	1.24	9.39
12	10	1	6.50	-1	25	1	0.54	9.55	0.36	7.20	0.87	5.41
13	7.5	0	7.00	1	20	0	1.03	17.9	0.57	12.2	1.30	10.4
14	5.0	-1	7.00	1	15	-1	1.57	37.7	0.70	22.9	1.85	21.3
15	5.0	-1	7.00	1	20	0	1.19	32.4	0.75	20.6	2.10	19.4
16	5.0	-1	6.5	-1	20	0	1.36	34.2	0.73	21.4	1.97	19.7
17	7.5	0	6.50	1	20	0	0.93	18.8	0.56	13.4	1.19	10.5
18	7.5	0	7.00	1	25	1	0.81	16.0	0.56	11.2	1.24	9.48
19	7.5	0	7.00	1	20	0	0.93	18.1	0.55	12.5	1.36	10.3
20	7.5	0	6.50	-1	20	0	0.85	18.5	0.43	12.9	1.22	10.4

Tabla 26. Coeficientes de ajuste experimentales obtenidos en los modelos matemáticos según las ecuaciones 10 y 11.

Parámetro	a ₀	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	R ²	SEE
diclofop-ácido												
Rs	0.63	-0.17 0.0001	0.08 0.0001	0.37 0.0001	-0.01 0.6736	-0.14 0.0001	0.07 0.0001	-0.003 0.8423	-0.04 0.0143	0.08 0.0001	99.2	0.04
t _{r2} '	8.68	-3.31 0.0001	1.55 0.0001	-3.38 0.0001	-0.35 0.2337	1.18 0.0001	0.21 0.4713	1.07 0.0001	-0.08 0.8425	2.01 0.0001	97	0.99
diclofop-metil												
Rs	0.76	-0.39 0.0001	0.003 0.8880	0.051 0.0533	-0.01 0.7150	-0.05 0.0730	-0.006 0.7935	-0.005 0.9052	-0.01 0.7226	-0.05 0.2269	98.7	0.06
t _{r2} '	17.3	-9.09 0.0001	1.17 0.0612	0.17 0.7358	-1.01 0.1225	0.54 0.3638	0.22 0.7032	3.31 0.0179	-0.78 0.4480	-0.39 0.6990	98.6	0.67
fluazifop-butil												
Rs	0.93	-0.36 0.0001	-0.001 0.9264	-0.14 0.0001	-0.003 0.8737	0.05 0.0923	0.01 0.4792	0.03 0.4440	-	0.03 0.3644	97	0.07
t _{r2} '	18.32	-11.39 0.0001	-0.42 0.0026	-2.87 0.0001	0.72 0.0003	1.60 0.0001	0.17 0.2596	3.88 0.0001		0.57 0.0280	99.9	0.98
quizalofop-etil												
Rs	0.52	-0.17 0.0001	0.03 0.0031	0.01 0.2838	-0.002 0.8905	-0.01 0.4068	-0.01 0.3454	0.01 0.5006	-	-0.02 0.2753	95.6	0.04
t _{r2} '	12.70	-6.50 0.0001	-0.34 0.0020	-1.57 0.0001	0.46 0.0013	0.73 0.0002	0.10 0.3660	1.91 0.0001		0.20 0.2590	99.7	0.37
mefenpyr-dietil												
Rs	1.34	-0.53 0.0001	-0.01 0.7530	-0.07 0.2428	-0.01 0.8212	-0.002 0.7541	0.05 0.3900	0.04 0.6446	-	0.02 0.7905	90.2	0.18
t _{r2} '	10.39	-6.78 0.0001	-0.04 0.3413	-1.13 0.0001	0.19 0.0049	0.56 0.0001	0.07 0.2325	2.49 0.0001		0.11 0.2315	99.9	0.19

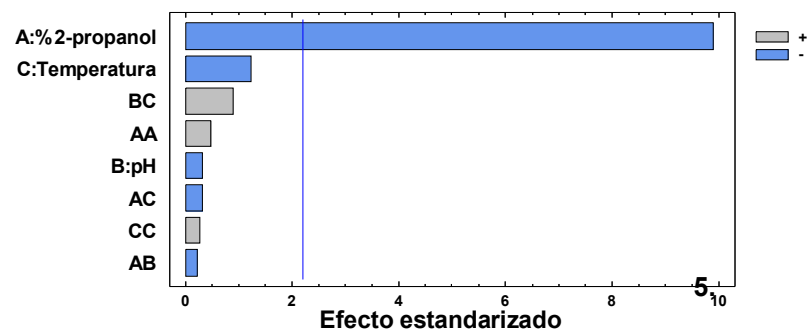
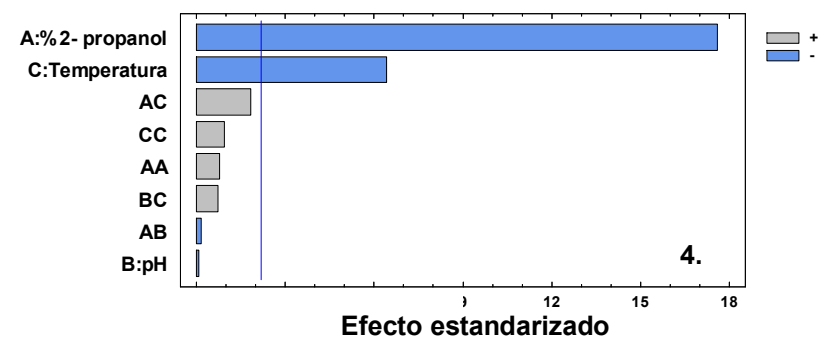
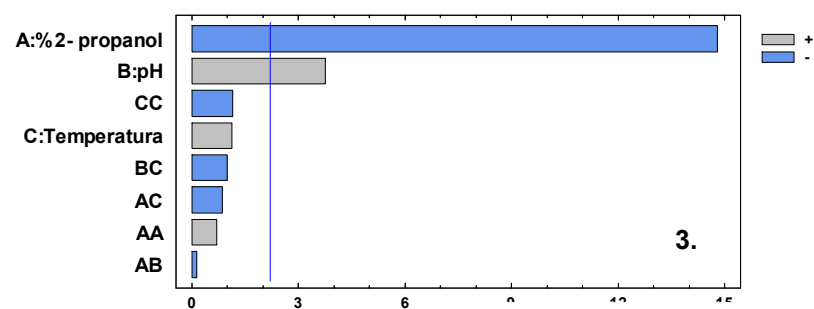
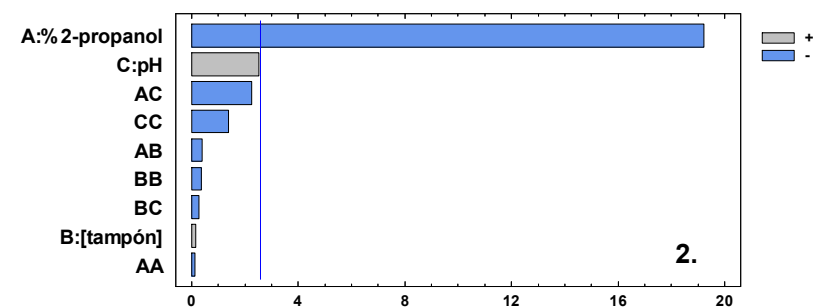
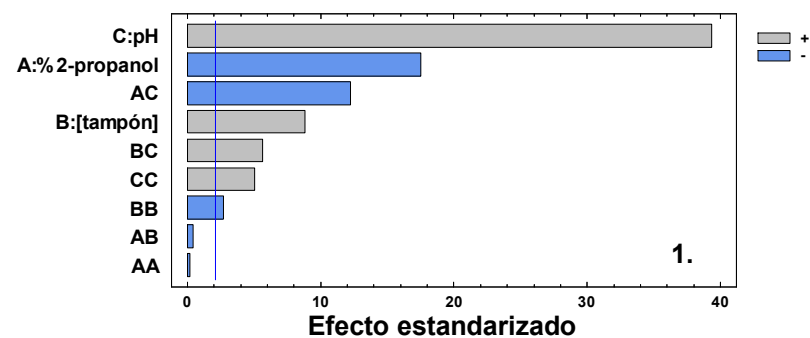


Figura 20. Gráficos de Pareto. Representación del peso de cada factor en la resolución enantiomérica del 1. diclofop-ácido, 2. diclofop-metil, 3. quizalofop-etil, 4. fluazifop-butil, 5. mefenpyr-dietil

Tanto el análisis de Pareto (figura 20), que muestra el peso de cada uno de los factores estudiados en cada respuesta, como los valores de los coeficientes de las ecuaciones (tabla 26) indican que la resolución enantiomérica de los cinco herbicidas estudiados depende, principalmente, de la proporción de 2-propanol de la fase móvil. La resolución de ambos enantiómeros está relacionada con el ancho de banda y el tiempo de retención de los mismos. A medida que el porcentaje de 2-propanol aumenta, los tiempos de retención de ambos enantiómeros disminuyen y por tanto, la resolución enantiomérica disminuye de igual manera, es decir tiene un efecto negativo sobre la enantioresolución. Una disminución en la proporción de modificador orgánico favorece las interacciones hidrofóbicas del analito en la columna, el ancho de banda de los picos y los tiempos de retención aumentan y por tanto se obtienen mayores valores de enantioresolución.

Con respecto al pH se observa que es un factor influyente en el caso del diclofop-ácido y del quizalofop-etil. En los dos casos, valores de pH elevados proporcionan enantioresoluciones mayores. En CSPs basadas en proteínas inmovilizadas el pH de la fase móvil no sólo controla la forma en la que se encuentran los analitos cuando éstos tienen características ácido base, si no que controla la retención de los mismos, ya que también regula la forma en la que se encuentre la glicoproteína (es recomendable trabajar en valores de pH próximos a su punto isoelectrico) (309-310). Sin embargo en el caso del diclofop-ácido, el pH es el factor con más peso. Una pequeña variación afecta de forma muy significativa a la enantioseparación. En los experimentos realizados a los valores más bajos de pH estudiados (pH=6.0) no es posible separar los enantiómeros, y aparecen en todos los casos en forma de un solo pico a los que se les asigna una resolución arbitraria de 0.30, valor asignado para el procesamiento de los datos, mientras que los experimentos realizados a valores más altos (pH 6.5 y 7) se obtienen resoluciones intermedias y altas respectivamente. Este efecto, se observa claramente en la figura 21 donde se recoge la representación de los valores de resolución obtenidos experimentalmente, frente a los valores de resolución predichos por el modelo matemático (línea naranja).

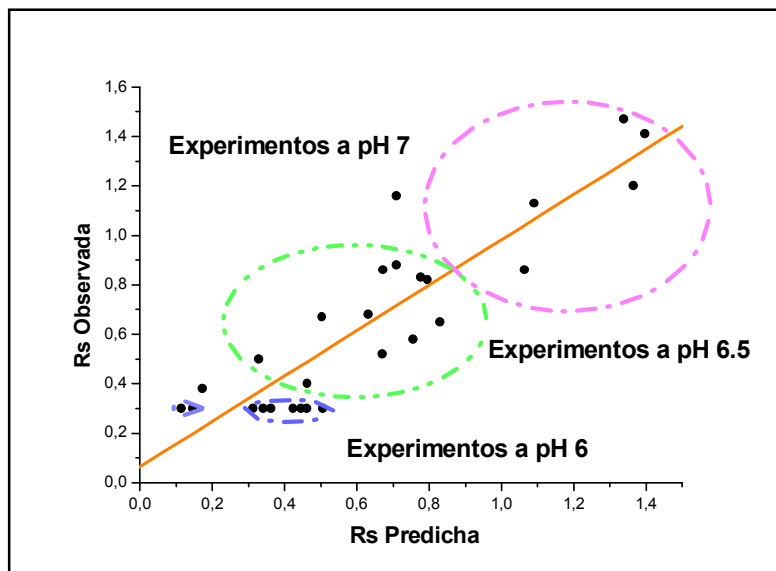


Figura 21. Representación de los valores experimentales de resolución frente a los predichos por el modelo para el diclofop-ácido.

La concentración de tampón fosfato resultó ser un factor influyente en la resolución enantiomérica del diclofop-ácido, la resolución mejora cuanto mayor es esta concentración. Sin embargo este factor no influye prácticamente en la resolución de los enantiómeros del diclofop-metil y por tanto no tiene peso en el modelo. La concentración de tampón, además de contribuir a regular el pH del medio, regula la fuerza iónica del mismo. Cuando la concentración de tampón se incrementa, aumentando así las interacciones iónicas de la fase móvil (311), la retención de los enantiómeros aumenta y por tanto la enantioresolución adquiere valores más altos.

En este tipo de fases estacionarias, cuando se utilizan fases móviles acuosas, en general, la retención disminuye con el incremento de temperatura y aumenta con la disminución de proporción de modificador orgánico (309, 310). Este efecto únicamente fue notable en el caso del fluazifop-butil, dónde un aumento de este factor proporciona peores valores de enantioresolución. La temperatura además de influir en la enantioresolución de los herbicidas estudiados, puede favorecer tanto la racemización de algunos compuestos quirales como la desnaturalización de la propia proteína (311).

Con respecto a los términos de interacción, o cruce entre factores, éstos únicamente tienen un peso importante en la enantioresolución del diclofop-ácido (figura 22).

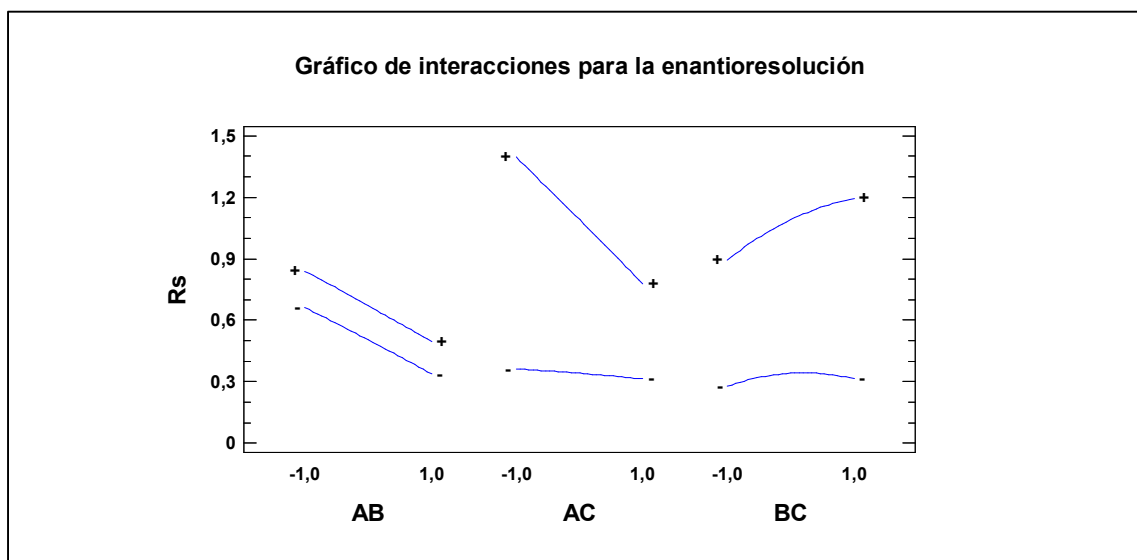


Figura 22. Gráfico de interacciones para la enantioresolución del diclofop-ácido
 A: Porcentaje de propanol en la fase móvil
 B: Concentración de tampón
 C: pH del tampón.

Según la figura 22 las interacciones con más peso en el modelo son el término propanol*pH y tampón*pH, con un efecto negativo y positivo respectivamente sobre la enantioresolución. Con respecto a los términos cuadráticos el término tampón*tampón y pH*pH presentan un efecto negativo y positivo respectivamente en la resolución de los enantiómeros del diclofop-ácido. La enantioselectividad resulta de las interacciones polares con los grupos próximos a los centros quirales. Cuando la cantidad de modificador orgánico se incrementa las interacciones dispersivas en la fase móvil aumentan, reduciendo la fuerza relativa de las interacciones dispersivas en la fase estacionaria. Se observa un efecto similar cuando la concentración de tampón se incrementa, aumentando de esta manera las interacciones iónicas de la fase móvil (311). En el resto de herbicidas estudiados, tanto los términos cuadráticos como los términos de interacción no tienen apenas peso sobre la enantioresolución.

Con respecto al tiempo de retención corregido del segundo enantiómero en el caso del diclofop-ácido y su éster, se vio significativamente afectado por la proporción de 2-propanol en la fase móvil. Un aumento en dicha proporción suponía una disminución del tiempo de análisis. La misma variación se observó en el diclofop-ácido con respecto al pH. El t_r' se vio afectado significativamente por los tres factores en el caso del fluazifop-butil y quizalofop-etil, mientras que el mefenpyr-dietil, el pH apenas tuvo influencia sobre el tiempo de retención corregido. El término cuadrático propanol*propanol tuvo una influencia significativa en el tiempo de retención de todos

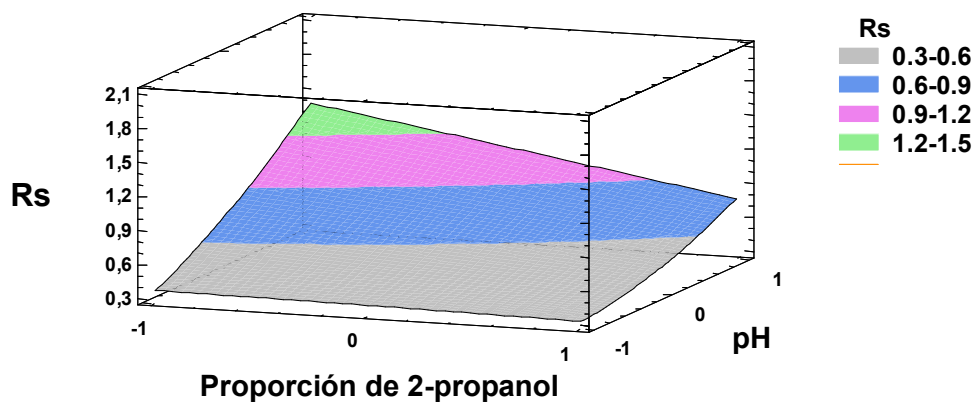
los compuestos a excepción del diclofop-ácido, dónde tuvo más peso el término cuadrático pH^2 . Con respecto a los términos de interacción cabe destacar que los cruces temperatura*propanol y propanol* pH y el término cuadrático propanol*propanol fueron significativos para el tiempo de retención corregido del fluazifop-butil, quizalofop-etil y mefenpyr-dietil respectivamente.

Si se fija la variable que menos afecta a la enantioresolución, por ejemplo la temperatura en el caso del quizalofop-etil y el pH en fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, o la concentración de tampón fosfato en el caso del diclofop-ácido y diclofop-metil, y de estas variables se toma el valor en el que se han obtenido los valores más altos de R_s en los diseños experimentales (temperatura de 20 °C en el caso del quizalofop-etil y pH 7 y 6.5 para el fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, concentración de tampón fosfato 70 mM para el diclofop-ácido y 30 mM para su éster, respectivamente) se pueden representar los resultados obtenidos en un gráfico de superficie de respuesta, que resulta muy útil para estimar la resolución que se puede obtener en unas condiciones cromatográficas dadas (figura 23).

Para el caso del diclofop-ácido (fig. 23.1), la superficie de respuesta estimada muestra que en general, proporciones bajas de modificador orgánico en la fase móvil y valores de pH altos, proporcionan resoluciones elevadas. La torsión que presenta la forma de dicha superficie, se debe al peso en la resolución enantiomérica de la interacción entre el pH y el modificador orgánico de la fase móvil. En el diclofop-metil (fig. 23.2) la superficie de respuesta muestra que en general, proporciones bajas de modificador orgánico en la fase móvil, prácticamente a cualquier valor de pH , proporcionan resoluciones altas. En el resto de herbicidas, quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil (fig. 24.3 a 24.5), las superficies de respuesta estimada muestran que proporciones bajas de modificador orgánico en la fase móvil, proporcionan resoluciones elevadas. En el caso del quizalofop-etil además son necesarios valores de pH altos, y en el caso del fluazifop-butil y mefenpyr-butil temperaturas bajas. La forma casi plana de las superficies pone de manifiesto la poca importancia de los términos de interacción y cuadráticos en la enantioresolución de estos tres herbicidas.

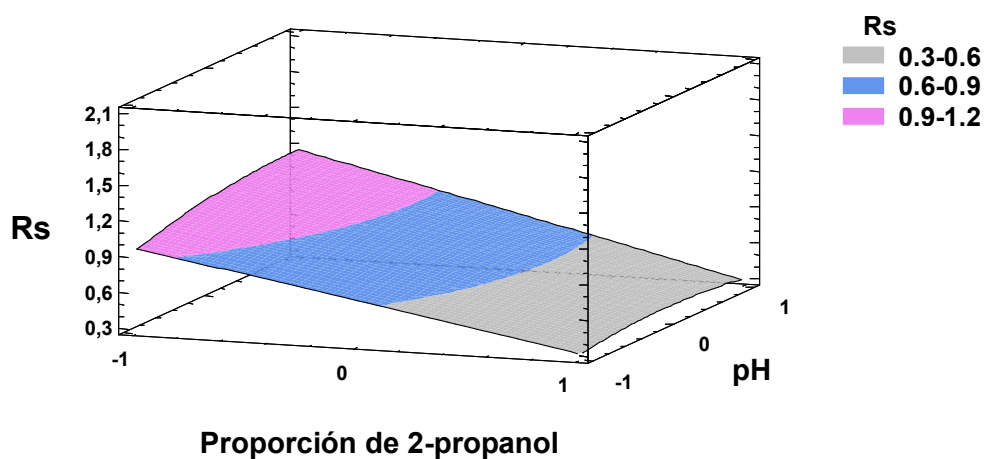
1.

Concentración de tampón fosfato
70 mM



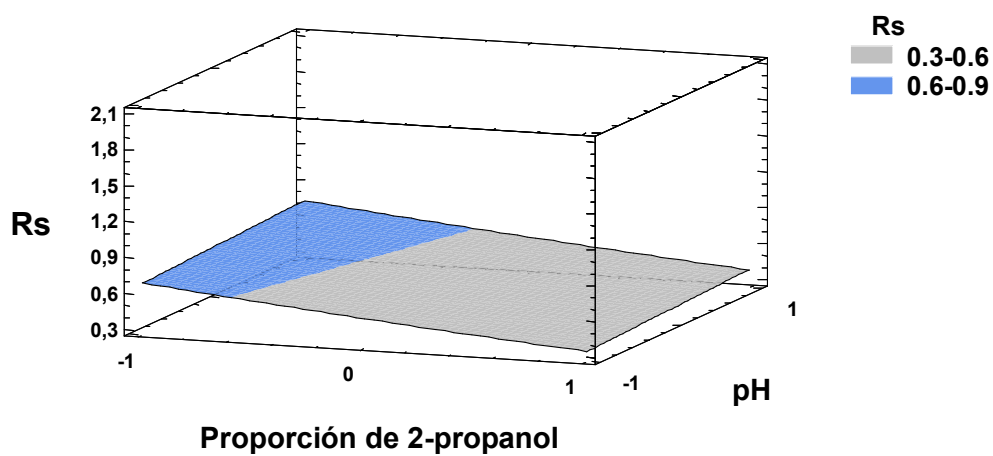
2.

Concentración de tampón fosfato
30 mM



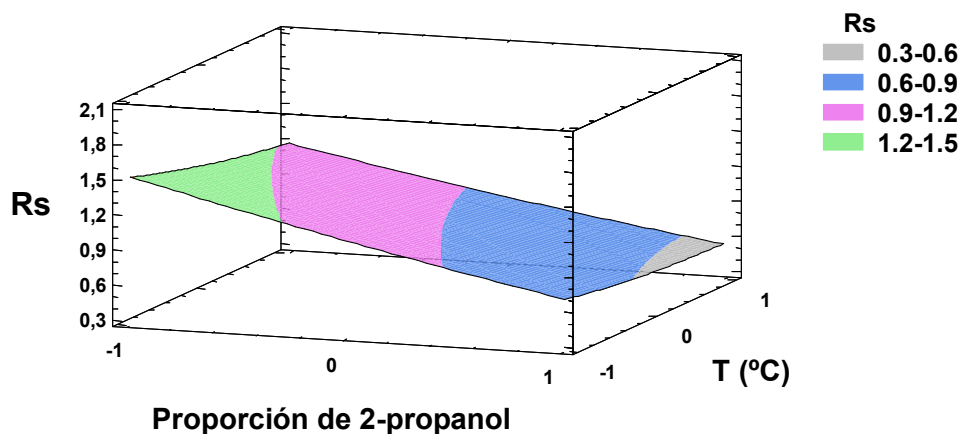
3.

Temperatura 20 °C



4.

pH 7



5.

pH 6.5

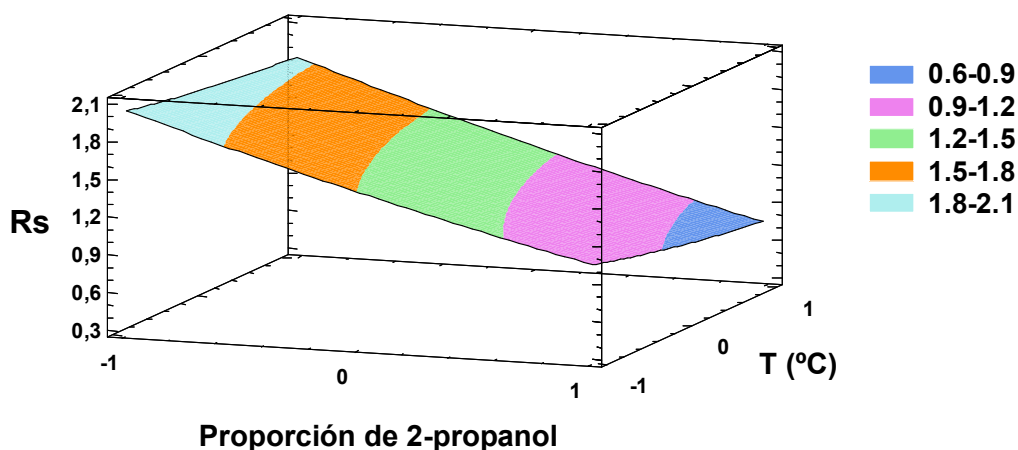


Figura 23. Mapas de superficie tridimensional estimada normalizada: 1. diclofop-ácido, 2. diclofop-metil, 3. quizalofop-etil, 4. fluazifop-butil, 5. mefenpyr-dietil

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de separación quiral de cada uno de los herbicidas con la fase estacionaria de α_1 -glicoproteína y teniendo en cuenta las respuestas experimentales obtenidas, se utilizó el análisis multirespuesta como herramienta de optimización. Dicha herramienta combina los factores experimentales optimizando a la vez las respuestas y maximizando la función de deseabilidad sobre la región seleccionada. El criterio seleccionado para el análisis multirespuesta fue que la fase móvil debía proporcionar $R_s \geq 1.0$ (en el caso del quizalofop-etil, como las resoluciones obtenidas fueron menores a la unidad el criterio en este caso fue la resolución máxima), y tr' mínimo, lo que permitiría obtener resoluciones aceptables en tiempos de análisis no excesivamente largos. Llegando a un compromiso entre los tres

factores evaluados, se escogieron fases móviles que se muestran en la tabla 27, realizando los análisis siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1 de la parte experimental.

Tabla 27. Condiciones óptimas para la separación y determinación quiral de diclofop-ácido, diclofop-metil, quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil.

CONDICIONES	HERBICIDA				
	diclofop ácido	diclofop metil	quizalofop etil	fluazifop etil	mefenpyr dietil
Fase móvil	2-propanol- tampón fosfato 70 mM pH 7.0 (0.5:99.5 v/v)	2- propanol- tampón fosfato 30 mM pH 7.0 (9:91 v/v)	2-propanol- tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (5:95 v/v)	2- propanol- tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (7:93 v/v)	2- propanol- tampón fosfato 10 mM pH 6.5 (9:91 v/v)
Longitud de onda (nm)	230				307
Temperatura (°C)	Ambiente		20	17	15

En las condiciones seleccionadas los enantiómeros del diclofop-ácido quedan resueltos a línea base con una resolución de 1.41 (R_s predicha= 1.40) y el tiempo de retención corregido del segundo enantiómeros es de 10.47 min (t_{r2}' predicho= 10.51). En el caso del diclofop-metil ambos enantiómeros quedan resueltos con una resolución de 1.20 (R_s predicha= 1.18) con un t_{r2}' para el segundo enantiómero de 24.51 min (t_{r2}' predicho= 24.76). En cuanto al fluazifop-butil y quizalofop-etil las condiciones óptimas de separación proporcionaron resoluciones de 1.19 y 0.78 (R_s predicha=1.18 y 0.75) y t_{r2}' de 21.6 min y 20.8 min respectivamente (t_{r2}' predicho=21 min y 20 min). Por último,, las resolución obtenida para el mefenpyr-dietil fue de 1.22 (R_s predicha=1.21) con un t_{r2}' para el segundo enantiómero de 7.97 min (t_{r2}' predicha=8 min). Los cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas de separación para cada una de los herbicidas se muestran en la figura 24.

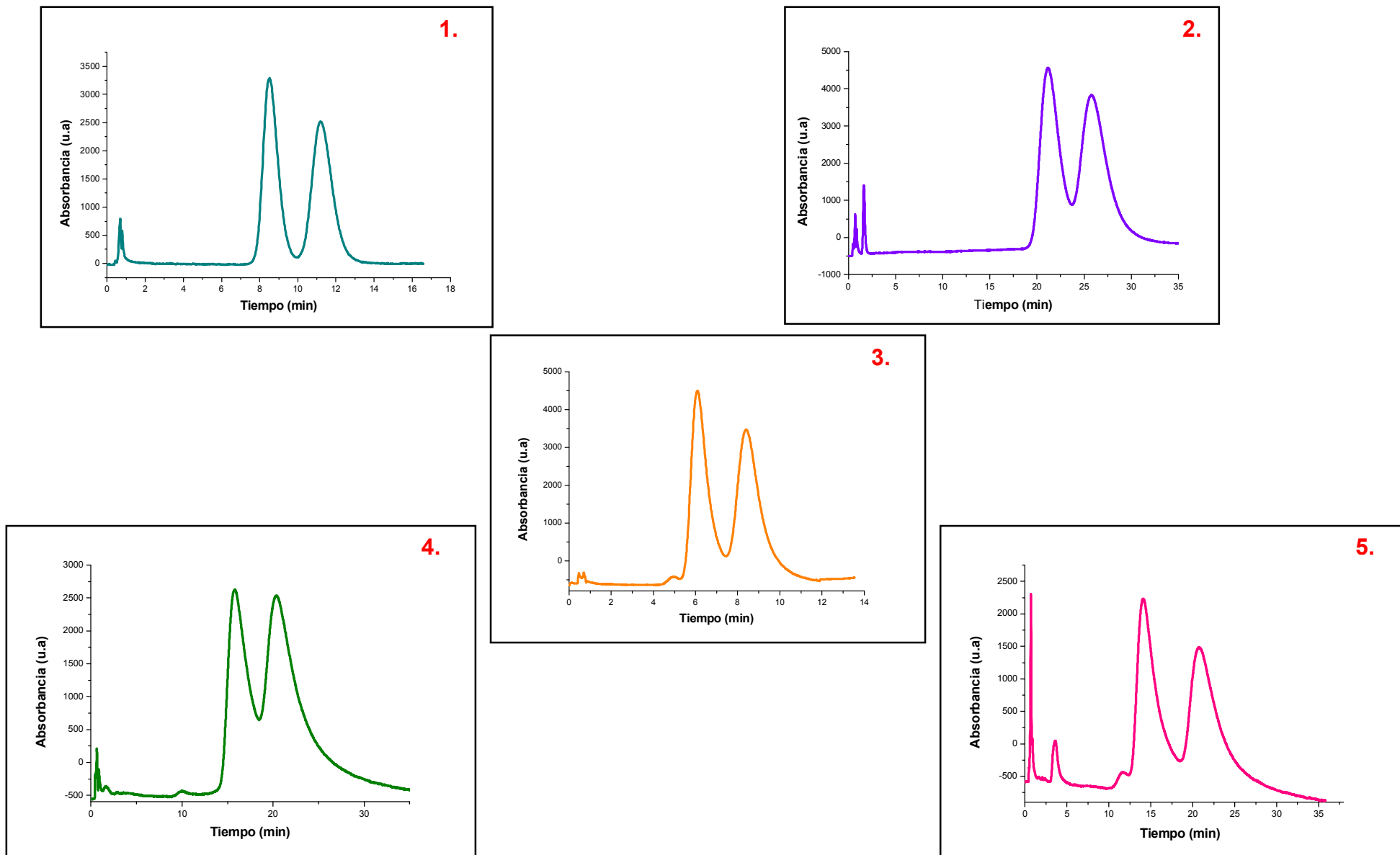


Figura 24. Cromatogramas de la separación quiral de 5 mg·L⁻¹ del racemato del 1. diclofop-ácido y 2. diclofop-metil y 12 mg·L⁻¹ del racemato del 3. del mefenpyr-dietl, 4. quizalofop-etil y 5. fluazifop-butil, obtenidos bajo las condiciones especificadas en la tabla 27.

Con el fin de comprobar la capacidad de predicción de los modelos matemáticos propuestos se realizaron una serie de ensayos de validación. Mediante las ecuaciones obtenidas en el diseño experimental se escogieron tres fases móviles, cuyas condiciones proporcionasen una resolución próxima a la unidad, entorno a la unidad y por encima de la unidad. En el caso del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, se fijaron la variables que menos afectaban a la enantioresolución (temperatura de 20 °C en el caso del quizalofop-etil y pH 7 y 6.5 para el fluazifop-butil y mefenpyr-dietil respectivamente). Además como la máxima resolución obtenida en el diseño experimental fue de 0.78 en el quizalofop-etil, se escogieron condiciones que proporcionaban resoluciones en torno al máximo y más bajas. Las fases móviles seleccionadas se muestran en las tablas 28 y 29.

Tabla 28. Fases móviles seleccionadas en el estudio de validación de los modelos matemáticos del diclofop-ácido y diclofop-metil.

Herbicida	Fase Móvil	2-propanol (%)	Concentración tampón fosfato (mM)	pH del tampón
diclofop-ácido	A	1	85	6.75
	B	1.1	94	7.00
	C	0.5	97	6.95
diclofop-metil	D	9.5	45	6.80
	E	12	35	6.40
	F	9	30	6.98

Tabla 29. Fases móviles seleccionadas en el estudio de validación de los modelos matemáticos del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil

Herbicida	Fase Móvil	2-propanol (%)	pH tampón fosfato 10 mM	Temperatura (°C)
quizalofop-etil	G	5.00	6.90	20
	H	5.25	6.75	20
	I	6.50	6.75	20
fluazifop-butil	J	5.50	7.00	16
	K	6.75	7.00	21
	L	9.75	7.00	24
mefenpyr-dietil	M	5.12	6.50	19
	N	9.73	6.50	17
	O	9.97	6.50	24

Además se llevo a cabo un estudio de repetibilidad del método de separación cromatográfico, realizando cinco inyecciones en el mismo día con cada una de las fases móviles seleccionadas para cada herbicida. Los resultados de la validación de los modelos matemáticos se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Resultados del estudio de validación de los modelos matemáticos obtenidos

Fase móvil	R_s predicha	R_s obtenida*	t_{r2}' (min) predicho	t_{r2}' (min) obtenido*
A	0.88	0.66 ± 0.04	8.17	8.3 ± 0.2
B	1.12	1.04 ± 0.02	7.81	7.8 ± 0.2
C	1.42	1.07 ± 0.08	10.97	11.5 ± 0.5
D	1.13	0.96 ± 0.07	25.30	25.4 ± 0.4
E	0.83	0.67 ± 0.06	16.87	16.9 ± 0.5
F	1.20	1.13 ± 0.04	25.81	25.2 ± 0.5
G	0.73	0.74 ± 0.02	20.6	20.9 ± 0.2
H	0.50	0.64 ± 0.03	12.1	19.2 ± 0.3
I	0.42	0.55 ± 0.03	9.49	14.7 ± 0.4
J	1.37	1.31 ± 0.07	32.5	31.9 ± 0.2
K	1.01	1.0 ± 0.2	20.8	20.4 ± 0.2
L	0.58	0.55 ± 0.04	10.8	10.4 ± 0.1
M	1.90	1.93 ± 0.06	19.7	18.7 ± 0.3
N	1.08	1.03 ± 0.07	7.22	6.42 ± 0.05
O	0.82	0.89 ± 0.08	5.73	5.55 ± 0.02

* El intervalo de confianza se ha calculado para un nivel del 95% y $n = 5$

A la vista de los resultados obtenidos, en el caso del diclofop-ácido y diclofop-metil (filas A, B, C y D, E, F, respectivamente), se comprueba que la resolución obtenida experimentalmente está por debajo de la resolución predicha por el modelo, sobretodo en aquellas fases móviles que predecían una resolución inferior y superior a la unidad. Sin embargo para la fase móvil que predecía una resolución entorno a la unidad, los resultados del método son bastante próximos a los experimentales.

Se ha comprobado que en el caso del quizalofop-etil (filas G, H, I), los resultados obtenidos experimentalmente de R_s , y t_r' son similares a los predichos por el modelo únicamente con las fases móviles que proporcionan resoluciones máximas. Sin embargo, en el caso del fluazifop-butil y el mefenpyr-dietil (filas J, K, L y M, N, O respectivamente), los resultados predichos por el modelo están dentro de los intervalos de confianza obtenidos experimentalmente tanto en la resolución como en la enantioselectividad y prácticamente a todos los tiempos de retención, lo que demuestra la fiabilidad de los modelos matemáticos obtenidos.

I.2.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS MÉTODOS DE SEPARACIÓN QUIRAL DE PATRONES INDIVIDUALES DE HERBICIDAS

Las características analíticas del método cromatográfico de separación quiral de cada herbicida, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo lineal y precisión, se establecieron en las condiciones óptimas de análisis especificadas para cada uno de ellos en la tabla 27 y siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 2.1. de la parte experimental.

Los LOD y LOQ de cada enantiómero se han determinado mediante el análisis de disoluciones cada vez más diluidas de los herbicidas hasta que la señal se confunde con el ruido, calculando el límite de detección como la concentración que corresponde con 3 veces la altura de la señal del ruido en las proximidades del pico cromatográfico y en el caso del límite de cuantificación con 10 veces la altura del ruido. Los intervalos lineales se han establecido analizando disoluciones patrón del racemato de cada herbicida con concentraciones comprendidas en el intervalo 0.250-80 mg·L⁻¹ en el caso del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil y 0.3-100 mg·L⁻¹ para el diclofop-ácido y diclofop-metil. Los resultados se han analizado mediante regresión lineal utilizando las áreas de pico de cada uno de los enantiómeros. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la resolución, y tiempo de retención corregido del segundo enantiómero eluido en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón con una concentración de 12 mg·L⁻¹. Se han realizado 5 réplicas en el mismo día (n= 5) durante tres días consecutivos (N= 15). En la tabla 31 se recogen los resultados junto con otras características analíticas de los métodos optimizados. Como se observa en los resultados mostrados en la tabla 31, todos los enantiómeros presentaron buena linealidad en los intervalos de concentración estudiados, con coeficientes de determinación (R²) comprendidos entre 0.9899 y 0.9980, mientras que los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero fueron menores o iguales a 0.110 mg L⁻¹ y 0.367 mg L⁻¹ respectivamente. Como se puede observar, la variación en el día fue inferior al 4.8% y 4.7% con respecto a la resolución, y tiempo de retención corregido respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores estimados del 5.0 %, y 5.7 % para la R_s y t_r' respectivamente. De este modo, se ha puesto de manifiesto la eficacia y buena la precisión de los métodos de separación quiral propuestos, los cuales permiten obtener, además, buena sensibilidad para todos los herbicidas.

Tabla 31. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de los racematos del diclofop-ácido, diclofop-metil, quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil.

Herbicida	Linealidad			LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)		Precisión en el mismo día (RSD, %)		Precisión entre días (RSD, %)	
	Concentración* (mg L ⁻¹)	R ²		1°	2°	1°	2°	R _s	t _{r2} ' (min)	R _s	t _r ' (min)
		1°	2°								
diclofop-ácido	0.150-50.0	0.9980	0.9980	0.020		0.060	0.070	1.3	2.4	2.5	1.9
diclofop-metil	0.300-50.0	0.9940	0.9980	0.070	0.090	0.260	0.290	2.2	3.2	3.1	4.0
fluazifop-butil	0.625-40.0	0.9951	0.9932	0.110		0.367		3.7	2.8	4.5	2.3
quizalofop-etil	0.250-40.0	0.9924	0.9899	0.054	0.063	0.180	0.210	1.2	4.7	1.0	5.70
mefenpyr-dietil	0.125-40.0	0.9932	0.9945	0.024	0.027	0.080	0.090	4.8	0.80	5.0	0.66

1° y 2° hacen referencia al primer y segundo enantiómero eluido respectivamente (n=8).

* referido a cada enantiómero

Por otra parte, también se evaluó la precisión del método cuando los herbicidas no se encuentran en forma racémica y el enantiómero R-(+) está presente en distinta concentración a la del S(-). Puesto que únicamente se dispone comercialmente del enantiómero R-(+) del fluazifop-butil y del quizalofop-etil, disoluciones del racémico de estos herbicidas se enriquecieron con distintas cantidades de dicho enantiómero con el fin de obtener mezclas de distinta proporciones enantioméricas R-(+)/ S(-) comprendidas entre 80:20 y 99:1, manteniendo constante en todos los casos la concentración total del racémico en $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Tendiendo en cuenta el límite de detección del enantiómero S(-), la máxima relación R-(+)/ S(-) cuantificable fue de 90:10 para el fluazifop butil y 95:5 para el quizalofop etil. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la resolución, y tiempo de retención corregido del segundo enantiómero eluido en el mismo día y entre días distintos, inyectando disoluciones patrón de distinta relación enantiomérica R-(+)/ S(-) manteniendo la concentración del racémico en $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se han realizado 3 réplicas en el mismo día ($n=3$). En la tabla 32 se recogen los resultados de dicho estudio, donde se observa que la variación en el día fue inferior al 5.3%, y 2 % para la R_s y t_{r2}' respectivamente. A modo de ejemplo se presentan los cromatogramas obtenidos para el fluazifop-butil y quizalofop-etil de distinta relación enantiomérica R-(+)/ S(-) se muestran en la figura 25.

Tabla 32. Precisión del método de separación quiral del fluazifop-butil y quizalofop-etil en distintas proporciones R-(+)/ S(-)

Herbicida	Proporción R-(+)/ S(-)	Precisión en el mismo día (RSD, %)^a	
		R_s	t_{r2}' (min)^b
fluazifop-butil	80:20	2.1	0.66
	90:10	4.5	2.0
quizalofop-etil	80:20	3.5	1.7
	90:10	5.3	1.3
	95:5	4.0	0.83

^aIntervalo de confianza (95%, $n=3$)

^bTiempo de retención corregido del segundo enantiómero eluido, S(-) para el fluazifop y R-(+) para el quizalofop.

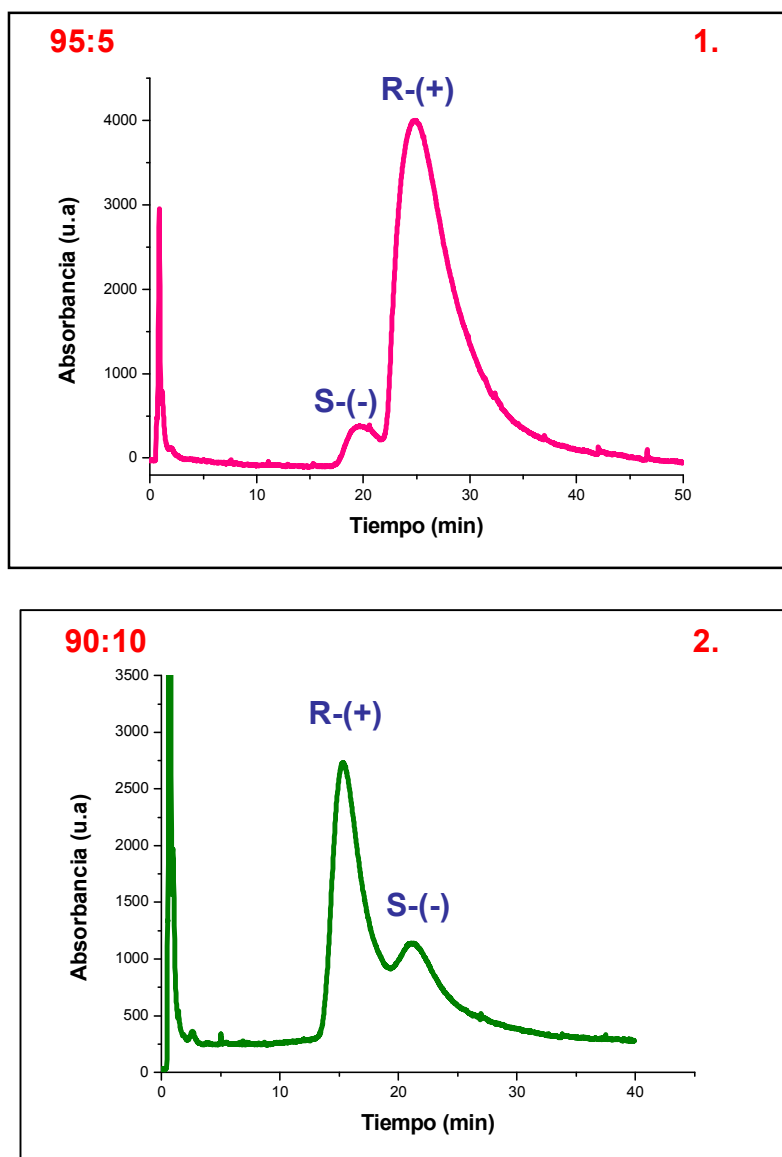


Figura 25. Cromatogramas de la separación quiral del 1. quizalofop-etil y 2. fluazifop-butil, en distintas relaciones enantioméricas R-(+)/ S-(-).

De los estudios expuestos anteriormente, cabe deducirse que las fases móviles y temperaturas necesarias para la separación de los enantiómeros de los herbicidas estudiados en la α_1 -glicoproteína ácida son diferentes y, por tanto, la separación simultánea de los enantiómeros de estos herbicidas, cuando se encuentran en una misma muestra, no es posible a menos que se utilice una elución en gradiente, y se cambie la concentración del tampón y el pH, lo que demuestra que dicha fase estacionaria quiral no permite la separación de muchos pares de enantiómeros en las mismas condiciones.

Así pues, en este punto de la memoria se hace necesario plantear distintas estrategias según se puedan encontrar estos herbicidas en muestras complejas como racémico o como diversas mezclas enantioméricas. En primer lugar, se evaluará la posibilidad de utilizar herramientas de deconvolución, con el fin de mejorar la cuantificación, en el análisis de los herbicidas estudiados cuando se determinan de forma independiente en muestras de suelo o de forma simultánea en preparados comerciales. Por último, se evaluará también el potencial de los acoplamientos cromatográficos bidimensionales de tipo aquiral-quiral en el análisis de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos para su aplicación a la determinación en muestras complejas que contienen más de un herbicida.

A continuación se muestran los resultados más significativos obtenidos en dichos estudios.

I.3. APLICACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS DE DECONVOLUCIÓN EN EL ANÁLISIS QUIRAL DEL QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL

I.3.1. SELECCIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Tal y como se señaló en los antecedentes en cromatografía quiral normalmente es difícil conseguir resoluciones mayores a la unidad en un tiempo de análisis razonable, quedando así la pareja de enantiómeros parcialmente superpuesta. Por otra parte, los mecanismos de separación en cromatografía quiral sufren una cinética de transferencia de masa entre el soluto y la fase estacionaria más lenta que en cualquier otro tipo de cromatografía, lo que hace que los picos cromatográficos presenten colas pronunciadas. En estas circunstancias la aplicación de modelos matemáticos de deconvolución parece ser una estrategia eficaz para el tratamiento de la señal cromatográfica ya que minimiza los errores asociados al ensanchamiento de los picos, proporcionando resultados más exactos en el cálculo de fracciones o relaciones enantioméricas en análisis de muestras complejas, donde los errores asociados a la estimación de las áreas de pico conllevan graves errores en el cálculo de dichos parámetros.

El estudio de la aplicabilidad de esta herramienta se llevó a cabo con los herbicidas quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, que en las condiciones de separación quiral optimizadas presentan enantioresoluciones muy diferentes, menores, en torno y superiores a la unidad respectivamente. Se aplicaron las diferentes herramientas de deconvolución disponibles en el paquete informático **PeakFit versión 4.12**, y los resultados se compararon con los proporcionados por el método manual de integración de la caída del valle (VDM), típico del software integrado en los cromatógrafos. Como paso previo, los cromatogramas obtenidos según el diseño experimental realizado (tabla 25), se convirtieron a formato ASCII (.txt), introduciéndolos en la herramienta informática para su posterior deconvolución. Con el objeto de establecer la mejor función de ajuste, se ensayaron varias funciones aplicadas con frecuencia a la deconvolución de picos cromatográficos: función Gaussiana (GD), función de Haarhoff-Van der Linde (HVL), función de Giggings y función Gaussiana exponencialmente modificada (EMG). De entre todas las funciones ensayadas la que mejor reproducía dicho comportamiento y minimizaba el error producido por el ensanchamiento de la cola del pico era la función Gaussiana

exponencialmente modificada (EMG), por lo que se decidió escoger dicha función para continuar el estudio. La función Gaussiana exponencialmente modificada (EMG), descrita en la Eq. [7], viene caracterizada por cuatro parámetros característicos; x e y representan el tiempo y la respuesta instrumental respectivamente, a_0 el área del pico, a_1 el centro del pico cromatográfico y a_2 la anchura del mismo y a_3 , es el parámetro de distorsión de pico. Una vez introducidos los cromatogramas en el programa Peakfit, se seleccionó únicamente la parte correspondiente a los picos de los enantiómeros para poder trazar así la línea base, sin utilizar la opción de filtrado digital que ofrece el programa. El ajuste automático de los picos de los dos enantiómeros a dos funciones de tipo EMG se realizó aplicando simultáneamente un filtrado del cromatograma y una localización y deconvolución única de los picos máximos. Seguidamente se procedió a la deconvolución de los cromatogramas hasta conseguir un valor máximo estable del coeficiente de correlación del modelo (R^2).

I.3.2. COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE INTEGRACIÓN DE LA CAÍDA DE VALLE (VDM) Y DEL MÉTODO MATEMÁTICO DE DECONVOLUCIÓN MEDIANTE LA FUNCIÓN EMG.

Seleccionado el modelo matemático, se procedió a la comparación de los valores de relación enantiomérica (ER), de fracción enantiomérica (EF) y de R_s , calculados mediante las Ecs. [5], [6] y [8] respectivamente obtenidos en las condiciones establecidas en el diseño experimental para dichos herbicidas y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.1. de la parte experimental. Para estos cálculos se utilizaron los parámetros cromatográficos obtenidos de tiempo de retención, área y anchura de pico mediante integración manual según el método de la caída de valle (VDM), en el que únicamente se tiene en cuenta una línea divisoria trazada en el valle intermedio entre los dos picos, y mediante la herramienta informática Peakfit, que permite la integración de los picos deconvolucionados. El criterio seleccionado para tomar como válida la deconvolución proporcionada por el software fue que el coeficiente de ajuste obtenido fuese mayor del 99%, asegurando así la no existencia de diferencias significativas entre el cromatograma obtenido mediante el modelo matemático y el experimental. Cabe destacar que en las deconvoluciones llevadas a cabo con los cromatogramas experimentales mediante el modelo matemático EMG, se obtuvieron en todos los casos coeficientes de correlación del modelo (R^2) en el intervalo 99.7-99.9 %. Los valores calculados de R_s , ER y EF mediante ambos métodos de integración se muestran en la tabla 33.

Tabla 33. Comparación entre los valores obtenidos mediante integración manual y mediante herramientas de deconvolución.

EXP.	fluazifop-butil						quizalofop-etil						mefenpyr-dietil					
	R_s VDM	R_s EMG	ER VDM	ER EMG	EF VDM	EF EMG	R_s VDM	R_s EMG	ER VDM	ER EMG	EF VDM	EF EMG	R_s VDM	R_s EMG	ER VDM	ER EMG	EF VDM	EF EMG
1	0.67	0.68	0.48	1.02	0.32	0.51	0.41	0.46	0.28	0.91	0.21	0.48	0.89	1.12	0.70	0.88	0.41	0.47
2	0.60	0.67	0.46	1.12	0.31	0.53	0.36	0.43	0.21	0.87	0.21	0.46	0.89	1.10	0.73	0.87	0.42	0.47
3	1.49	1.93	1.03	1.08	0.51	0.52	0.60	0.66	0.37	1.06	0.32	0.51	1.87	2.20	1.01	0.98	0.5	0.5
4	1.18	1.41	0.91	0.90	0.48	0.47	0.44	0.41	0.42	1.16	0.22	0.54	1.95	1.51	0.09	1.00	0.08	0.5
5	1.17	1.35	0.81	1.07	0.45	0.52	0.67	0.65	0.30	1.18	0.33	0.54	1.89	2.24	1.04	1.01	0.51	0.5
6	1.23	1.51	0.84	0.98	0.46	0.50	0.74	0.74	0.21	0.87	0.36	0.47	1.91	2.23	1.01	1.01	0.50	0.5
7	0.64	0.65	0.45	1.07	0.31	0.52	0.30	0.33	0.44	1.16	0.40	0.54	0.86	1.03	0.67	0.84	0.40	0.46
8	0.54	0.53	0.35	1.10	0.26	0.52	0.36	0.39	0.59	1.00	0.17	0.50	0.80	1.05	0.60	0.81	0.38	0.45
9	0.70	0.77	0.52	1.05	0.34	0.51	0.30	0.33	0.64	1.00	0.38	0.50	0.87	1.07	0.69	0.84	0.41	0.46
10	1.04	1.15	0.80	0.99	0.44	0.50	0.54	0.56	0.58	1.17	0.30	0.54	1.32	1.58	0.92	0.98	0.48	0.5
11	0.78	0.88	0.62	1.01	0.38	0.50	0.46	0.44	0.40	1.05	0.23	0.51	1.24	1.51	0.85	0.95	0.46	0.49
12	0.54	0.55	0.37	1.13	0.27	0.53	0.36	0.35	0.37	1.18	0.17	0.54	0.87	1.03	0.65	0.8	0.39	0.44
13	1.03	1.15	0.82	1.01	0.45	0.50	0.57	0.58	0.40	1.14	0.31	0.53	1.30	1.51	0.93	0.99	0.48	0.5
14	1.57	1.78	1.06	1.19	0.51	0.54	0.70	0.72	0.25	1.07	0.37	0.52	1.85	2.22	0.99	0.97	0.50	0.49
15	1.19	1.73	0.93	1.07	0.48	0.52	0.75	0.71	0.45	1.06	0.39	0.51	2.10	2.48	1.05	1.00	0.51	0.5
16	1.36	1.43	1.02	1.18	0.51	0.54	0.73	0.70	0.11	1.18	0.37	0.54	1.97	2.34	1.07	1.01	0.52	0.5
17	0.93	1.07	0.79	1.04	0.44	0.51	0.56	0.56	0.28	1.10	0.29	0.52	1.19	1.48	0.83	0.98	0.45	0.5
18	0.81	0.94	0.62	0.97	0.38	0.49	0.56	0.55	0.21	1.02	0.27	0.51	1.24	1.46	0.89	0.96	0.47	0.49
19	0.93	1.05	0.71	1.00	0.41	0.50	0.55	0.56	0.37	1.03	0.29	0.51	1.36	1.55	0.96	0.97	0.49	0.49
20	0.85	1.01	0.66	0.98	0.4	0.50	0.43	0.41	0.42	1.14	0.20	0.53	1.22	1.46	0.84	0.94	0.46	0.48
Valor medio	-	-	0.71	1.05	0.41	0.51	-	-	0.30	1.06	0.30	0.51	-	-	0.82	0.94	0.45	0.48
Intervalo de confianza ^a	-	-	0.10	0.03	0.08	0.03	-	-	0.21	0.05	0.04	0.04	-	-	0.11	0.03	0.09	0.03

^a calculado para un nivel de confianza del 95%

A la vista de los resultados mostrados en la tabla 33, se observa que en la mayoría de los experimentos, los valores de R_s enantiomérica obtenidos mediante el método VDM y el modelo EMG son similares para los tres herbicidas.

Por otro lado, las R_s calculadas mediante el modelo EMG se ajustaron a la ecuación polinómica de segundo grado mostrada en la Ec. [10] y se obtuvieron valores de coeficiente de correlación múltiple (R^2) y errores de estimación estándar (SEE) similares a los obtenidos con el método de integración manual VDM (tabla 26). Además, se comprobó que en las condiciones de separación seleccionadas para los enantiómeros de cada herbicida (tabla 27), la R_s predicha por el modelo matemático obtenido con los parámetros cromatográficos proporcionados por la función EMG, se aproximan, en general, más a los experimentales que aquellos proporcionados por el modelo matemático obtenido a partir de la integración manual, tal y como se muestra en la tabla 34.

Tabla 34. Comparación de la resolución obtenida experimentalmente, mediante VDM y EGM.

Parámetro	quizalofop-etil	fluazifop-butil	mefenpyr-dietil
R^2 , % (VDM)	95.57	97.00	90.15
R^2 , % (EGM)	95.70	97.84	98.95
SEE (VDM)	0.04	0.07	0.19
SEE (EGM)	0.04	0.07	0.06
R_s experimental	0.78	1.19	1.22
R_s predicha (VDM)	0.75	1.08	1.21
R_s predicha (EGM)	0.85	1.28	1.22

Del mismo modo los cromatogramas obtenidos de aquellas mezclas que contenían distintas proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-) del fluazifop-butil y quizalofop-etil (tabla 32) se deconvolucionaron para calcular en este caso la fracción enantiomérica EF. En la tabla 35 se recogen los resultados de dichas deconvoluciones y en la figura 26 se muestran los cromatogramas deconvolucionados obtenidos en las condiciones óptimas de separación para cada uno de los herbicidas estudiados. Tal y como se ha reseñado en otros puntos de la memoria, la manera más habitual de describir la proporción entre las concentraciones del par de enantiómeros suele la relación enantiomérica ER (Ec. [5]), que adquiere como valor la unidad en el

caso de una mezcla racémica en la que las concentraciones de ambos enantiómeros son iguales.

Tabla 35. Parámetros cromatográficos obtenidos en distintas proporciones R-(+)/ S-(-)

Herbicida	Proporción R-(+)/ S-(-)	EF ^a VDM	EF ^a EMG	EF teórico
fluazifop-butil	80:20	0.69 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.80
	90:10	0.78 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.90
quizalofop-etil	80:20	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.20
	90:10	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10
	95:5	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05

^anivel de confianza 95 %, n=3

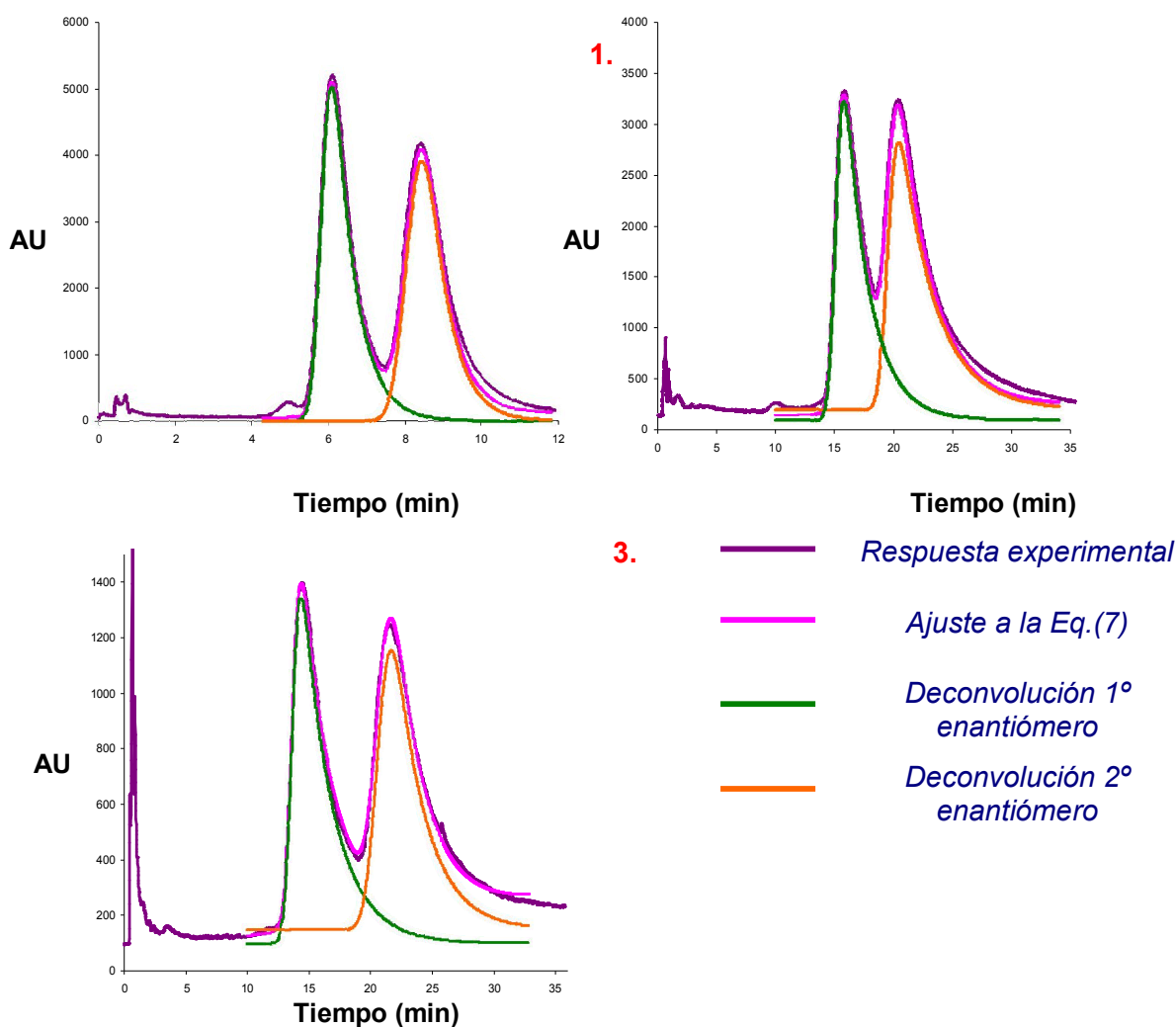


Figura 26. Cromatograma de la deconvolución mediante la función EMG de la separación quiral de 1. mefenpyr-diethyl, 2. quizalofop-etil, 3. fluazifop-butil en las condiciones óptimas seleccionadas

Sin embargo existen algunas limitaciones en el uso de dicho parámetro, por esta razón, se suele utilizar la fracción enantiomérica EF (Ec. [6]), que puede tomar valores de 0 a 1 siendo 0.5 el valor típico de mezclas racémicas, cuando se realizan estudios ambientales o de degradación o biotransformación de herbicidas (291).

Si se observan los valores mostrados en la tabla 33, se puede comprobar que existen diferencias notables entre los valores de ER y EF obtenidos por el método de integración VDM y mediante deconvolución según la función EMG. Así, las relaciones y fracciones enantioméricas obtenidas mediante el método VDM, especialmente en el caso del quizalofop-etil, difieren substancialmente de los valores teóricos de 1 y 0.5 respectivamente, que corresponden a las mezclas racémicas. En el caso del fluazifop-butil, las ER y EF experimentales únicamente se aproximan a 1 y 0.5 cuando la Rs es superior a 1.3 (experimentos 13, 14 y 16), situación en la que los enantiómeros están resueltos a línea base y no es necesario utilizar el método de la caída de valle para integrar. En el caso del mefenpyr-dietil como las enantioresoluciones fueron las más elevadas, los valores de ER y EF obtenidos por el método VDM y EMG fueron bastante similares entre sí, sobretodo los de EF y a la vez fueron más aproximados al valor teórico de 1 y 0.5 respectivamente.

Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos en el cálculo de ER y EF por el método de integración manual VDM y por las herramientas de deconvolución utilizando el modelo matemático EMG presentaban diferencias significativas, se decidió aplicar el test t de Student de comparación de medias de dos series. En el caso del fluazifop-butil y quizalofop-etil, se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos a un nivel de confianza del 95 % y únicamente en el caso del mefenpyr-dietil, los resultados obtenidos mediante ambos métodos de integración fueron comparables. Los valores de las relaciones y fracciones enantioméricas proporcionadas por la función EMG se encuentran próximos a los valores teóricos de 1 y 0.5 respectivamente en todos los experimentos realizados tanto en el caso que de enantioresoluciones bajas (ej. experimento 8 del quizalofop-etil) dónde resultan especialmente útiles, enantioresolución medias (ej. experimento 10 del fluazifop-butil) y enantioresolución altas (ej. experimento 4 del mefenpyr-dietil), demostrándose que las herramientas de deconvolución parecen ser más apropiadas para la integración, la estimación de las áreas de pico en LC quiral y el cálculo de las relaciones y fracciones enantioméricas que los métodos convencionales de integración manual, ya que minimizan los típicos errores asociados al sesgo de los picos cromatográficos cuando se encuentran parcialmente solapados.

La utilización de las herramientas de deconvolución, también resultó especialmente útil en el cálculo de las EF de aquellas mezclas de fluazifop-butil y quizalofop-etil que contenían distintas proporciones R-(+)/ S-(-). Tal y como se muestra en la tabla 35 los valores de EF obtenidos mediante VDM y EMG difieren significativamente entre si y únicamente los obtenidos mediante deconvolución son más próximos a los valores teóricos, de ahí que se ponga de manifiesto la importancia de la determinación con exactitud y precisión del valor de las áreas de pico cromatográfico en mezclas no racémicas para una correcta determinación de la fracción enantiomérica.

I.3.3. DETERMINACIÓN QUIRAL DEL QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL EN SUELOS

La utilidad de los métodos de separación quiral optimizados mediante diseño experimental, junto con la aplicación de las herramientas matemáticas de deconvolución, se evaluó en el análisis de los enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos estudiados en suelos fortificados con distintos niveles de concentración y distintas proporciones enantioméricas (proporciones R-(+)/ S-(-)).

Debido a su persistencia, naturaleza polar y solubilidad en agua, los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos se dispersan con facilidad en el medio ambiente y sus residuos, dependiendo de la naturaleza, acidez y contenido de materia orgánica del suelo, pH, salinidad, temperatura contenido de oxígeno y humedad (4), pueden permanecer en esta matriz durante un periodo comprendido entre 1 día y 20 semanas (7). Por ello en primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de las principales propiedades fisico-químicas del suelo muestreado.

I.3.3.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Con el fin de realizar la determinación quiral de los herbicidas objeto de estudio se escogió un suelo arenoso procedente de la localidad de Valdeavero (Madrid), no tratado con herbicidas y despoblado de vegetación. El muestreo de dicho suelo se realizó a una profundidad de 3 cm en una superficie escogida al azar de 20 x 30 cm ($\approx 40 \text{ Kg m}^{-2}$ de tierra). El suelo proveniente del muestreo se caracterizó determinando su textura mediante análisis granulométrico, pH, materia orgánica, contenido de humedad, conductividad y densidad, mediante los procedimientos descritos en el apartado 2.1.2.

de la parte experimental. En la tabla 36 se recogen las propiedades físico-químicas más relevantes del suelo muestreado y su origen.

Tabla 36. Propiedades físico-químicas del suelo muestreado.

Textura (USDA)	Suelo franco arenoso
Arcilla ($< 2 \mu\text{m}$) %	1
Limo ($< 50-2 \mu\text{m}$) %	19
Arena ($2000-50 \mu\text{m}$) %	80
pH (en agua 1:2,5)	7.9
Materia orgánica (% suelo seco)	4
Contenido relativo de humedad (%)	15
Conductividad (25°C) $\mu\text{S cm}^{-1}$	577

Según los resultados mostrados en la tabla anterior, se puede deducir que el suelo escogido en el estudio es un suelo alcalino ($\text{pH} > 7.5$), arenoso, con contenido en materia orgánica y fertilidad satisfactorias (437).

I.3.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Los herbicidas en forma de ésteres pueden resultar aun más persistentes debido a su menor solubilidad, y para determinarlos como tal, el procedimiento de tratamiento de muestra debe asegurar la conservación en su forma original, lo que puede no resultar fácil y en ocasiones posible. Por ello, los ésteres de los ariloxifenoxipropiónicos se suelen determinar habitualmente, previa etapa de hidrólisis, como sus ácidos correspondientes (188).

En el presente estudio, se ha desarrollado un método para la determinación de quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en muestras de suelo. Para evitar tanto las transformaciones de un enantiómero en otro y mantener inalterados los ésteres de los herbicidas, la preparación de la muestra se ha realizado mediante con disolventes orgánicos como acetonitrilo o acetona en baño de ultrasonidos a temperatura ambiente.

- **Estudio de la eficacia de la extracción.**

Como paso previo a la optimización de la extracción de los herbicidas objeto de estudio, se llevaron a cabo una serie de pruebas con blancos de suelo sin enriquecer sometidos a diferentes procedimientos de extracción con disolventes orgánicos y utilizando diferentes procedimientos mecánicos: agitación en baño de ultrasonidos, agitación en vortex y agitación mecánica, en las mismas condiciones (5 minutos de tratamiento, y 2 mL de metanol) y un blanco preparado mediante el método de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS) utilizando agitación mecánica en vortex y sulfato magnésico como medio extractante y amina primaria/secundaria (PSA) y agitación en vortex nuevamente en la etapa de “clean up” según el procedimiento descrito por Romero y col. (236), para controlar la posibilidad de extracción de materia endógena y posibles interferentes en los tiempos de retención correspondientes a los enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. Finalmente se seleccionó la extracción con disolventes combinada con la agitación en ultrasonidos como método de extracción más adecuado al ser el tratamiento más suave y que extraía menos materia endógena interferente.

Las condiciones óptimas para la extracción de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos de las muestras de suelo, se han establecido en función de parámetros como la naturaleza y volumen de disolvente, tiempo de extracción y número de extracciones consecutivas. Todos los experimentos se han realizado con 1 gramo de muestra y una cantidad adicionada de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el mefenpyr-dietil y $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el quizalofop-etil y fluazifop-butil respectivamente evaluando la recuperación obtenida en cada caso mediante comparación de las áreas obtenidas en un extracto de suelo enriquecido con la misma concentración.

Siguiendo el método propuesto por Rosales y col. (226) los estudios se comenzaron realizando tres etapas de extracción, con un volumen de disolvente de 2.0 mL y un tiempo de agitación en baño de ultrasonidos de 5.0 min en cada una de ellas. Como agentes extractantes se han estudiado metanol, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, hexano, acetonitrilo acidificado con un 1% de ácido acético y acetonitrilo con un 1 % de amoníaco. Después de cada extracción los extractos se separaron del residuo sólido mediante centrifugación a 4200 rpm durante 10 minutos, recogiendo los extractos en un tubo de centrífuga. El extracto final se evaporó a sequedad a vacío bajo corriente de nitrógeno reconstituyendo las muestras con 0.5 mL de la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica. Las recuperaciones obtenidas en cada caso se muestran en la tabla 37.

Tabla 37. Influencia del agente extractante en la eficacia de extracción de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos en muestras de suelo

Etapas de extracción con ultrasonidos			Recuperación (%)					
1ª	2ª	3ª	quizalofop-etil		fluazifop-butil		mefenpyr-dietil	
			1º	2º	1º	2º	1º	2º
MeOH	MeOH	MeOH	nd		20±6	18±3	17±2	16±3
Acetona	Acetona	Acetona	74±3	77±5	nd		29±4	30±2
ACN	ACN	ACN	nd		57±3	52±5	50±3	48±2
Acetato de etilo	Acetato de etilo	Acetato de etilo	nd		nd		14±3	15±4
Diclorometano	Diclorometano	Diclorometano	11±4	8±5	nd		13±5	14±4
Hexano	Hexano	Hexano	34±2	30±4	nd		nd	
ACN + 1% Acético	ACN + 1% Acético	ACN + 1% Acético	nd		73±5	69±4	82±3	86±4
ACN + 1% NH ₃	ACN + 1% NH ₃	ACN + 1% NH ₃	nd		30±4	33±4	60±4	67±5

*2.0 mL de disolvente, tiempo de extracción 5.0 min, nd: no se detecta en el extracto
1º y 2º hacen referencia al primer y al segundo enantiómero respectivamente
n=3

Como se puede observar a través de los resultados mostrados en dicha tabla, las mayores recuperaciones en el caso del fluazifop-butil y mefenpyr-dietil se han obtenido mediante el uso de acetonitrilo acidificado con un 1 % de ácido acético. Estos resultados parecen estar de acuerdo con los resultados de Díez y col. (438), quienes sugirieron que en muchas ocasiones la modificación de acetonitrilo con un 1% de ácido acético o amoníaco, favorecía la desorción de los herbicidas en las muestras de suelo, promoviendo su extracción de la matriz. Con el fin de evaluar la posibilidad de hidrólisis del éster, se realizaron ensayos similares sobre disoluciones patrón y no se observó hidrólisis del mismo durante el proceso de extracción a los niveles de detección del método de determinación. En el caso del quizalofop-etil únicamente tres de los extractantes fueron capaces de promover la desorción del herbicida del suelo, sin embargo, tan sólo el uso de acetona proporcionó recuperaciones por encima del 70%.

En relación al volumen de agente extractante se estudiaron diferentes volúmenes comprendidos entre 2-10 mL. La utilización de volúmenes mayores de 2 mL (5 y 10 mL) no conducía a un aumento considerable en las recuperaciones de cada herbicida. Así por tanto se escogió finalmente un volumen de 2 mL para facilitar el posterior proceso de evaporación del disolvente y disminuir así el tiempo de análisis.

Con objeto de reducir el volumen de los extractos de suelo recogidos se han llevado a cabo diversos ensayos basados en la evaporación del disolvente de extracción. Puesto que cualquier modificación en la disolución de inyección podría modificar la enantioresolución obtenida, se procedió a la evaporación de los extractos a sequedad para la posterior reconstitución en la fase móvil correspondiente. Para ello se realizaron algunos ensayos utilizando un dispositivo de evaporación a vacío con corriente de nitrógeno y mediante baño de agua a temperatura controlada. A pesar de que la evaporación del disolvente mediante baño de agua a temperatura controlada (45 °C) se completaba en un menor tiempo, con el fin de evitar las posibles pérdidas o alteraciones por el efecto de la temperatura, finalmente, los extractos se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a vacío.

Una vez optimizada la naturaleza y el volumen del disolvente extractante, se ha evaluado la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de los herbicidas. Para ello, cada una de las tres etapas de extracción se ha realizado con el agente extractante adecuado durante tiempos de 2.0, 5.0 y 10.0 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27.

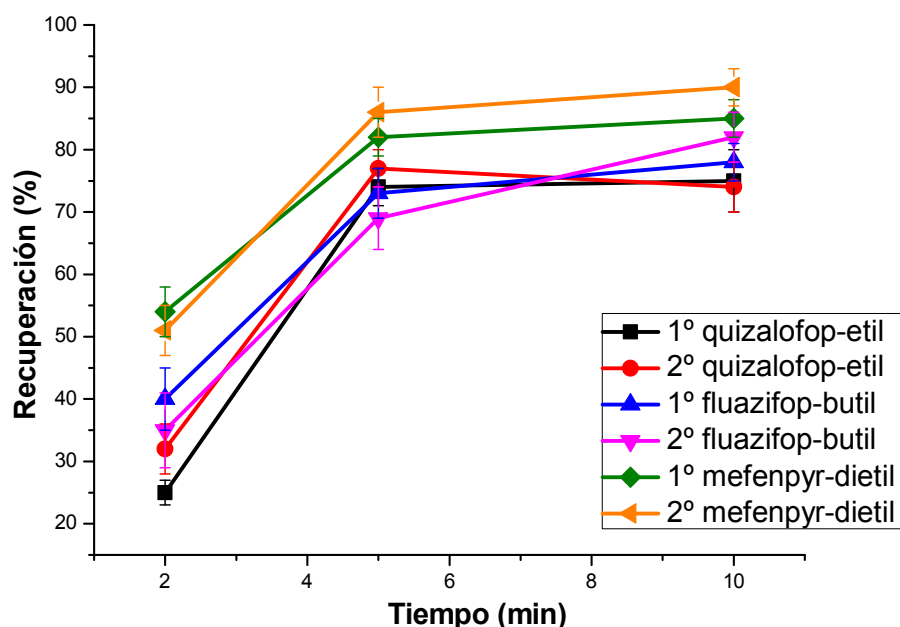


Figura 27. Influencia del tiempo en la eficacia de extracción con baño de ultrasonidos para cada uno de los enantiómeros

Como se puede observar en la figura anterior, la lixiviación de los enantiómeros de los herbicidas estudiados no se completa cuando la agitación se realiza durante 2.0

min. Con un tiempo de extracción de 10.0 min las recuperaciones para todos los herbicidas son similares a las obtenidas con un tiempo de 5.0 min, por lo que llegando a un compromiso entre el tiempo de análisis y la recuperación obtenida se ha seleccionado 5 minutos como el valor óptimo para cada etapa de extracción.

Finalmente se evaluó el número de extracciones para conseguir las máximas recuperaciones. Para ello, se han realizaron ensayos que implicaron una etapa de extracción de 15 minutos y 3 etapas consecutivas de 5 minutos. La utilización de extracciones sucesivas con acetona en el caso del quizalofop-etil, y acetonitrilo acidificado con un 0.1 % de ácido acético en para el fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, conducía a un aumento considerable de las recuperaciones de todos los herbicidas estudiados, así por tanto se escogió finalmente la realización de tres extracciones de 5 minutos cada una de ellas.

▪ **Aplicación de las herramientas de deconvolución en el análisis de suelos**

Como se ha demostrado anteriormente, la deconvolución de picos cromatográficos parcialmente solapados parece ser la herramienta de integración más adecuada cuando se calculan descriptores quirales como la ER y la EF. Además en muestras complejas la coextracción de materia endógena de la matriz que puede coeluir con los analitos de interés, da lugar a graves errores en la estimación de las áreas de pico. Es en estos casos también la deconvolución puede resultar de gran interés para obtener áreas de pico más precisas y por tanto cálculos de ER y EF más exactos.

Con el fin de evaluar la aplicabilidad de las herramientas de deconvolución en el análisis de muestras reales, muestras de 1 g de suelo se enriquecieron con distintas cantidades de los herbicidas estudiados para obtener concentraciones finales de racemato similares o algo superiores a las empleadas en agricultura (4 L de formulación por hectárea) (8). Considerando la porción de suelo muestreada ($\approx 40 \text{ kg m}^{-2}$ de tierra) y la cantidad de ingrediente activo de las formulaciones comerciales (5 y 12 %), la tasa de aplicación más alta de estos herbicidas en forma racémica es de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($200 \text{ g a.i.ha}^{-1}$) para el mefenpyr-dietil y $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($400 \text{ g a.i.ha}^{-1}$) y $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($1000 \text{ g a.i.ha}^{-1}$), en el caso del quizalofop-etil y fluazifop-butil respectivamente. Por tanto, los niveles de adición escogidos están en el intervalo de $0.50\text{-}2.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el mefenpyr-dietil y $1.0\text{-}4.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $2.5\text{-}6.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el quizalofop-etil y fluazifop-butil respectivamente. Por otra parte, algunas muestras de suelo se enriquecieron con

distintas proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-) del fluazifop-butil y quizalofop-etil, a niveles de adición de 4.0 y $9.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y relaciones enantioméricas 80:20 y 90:10.

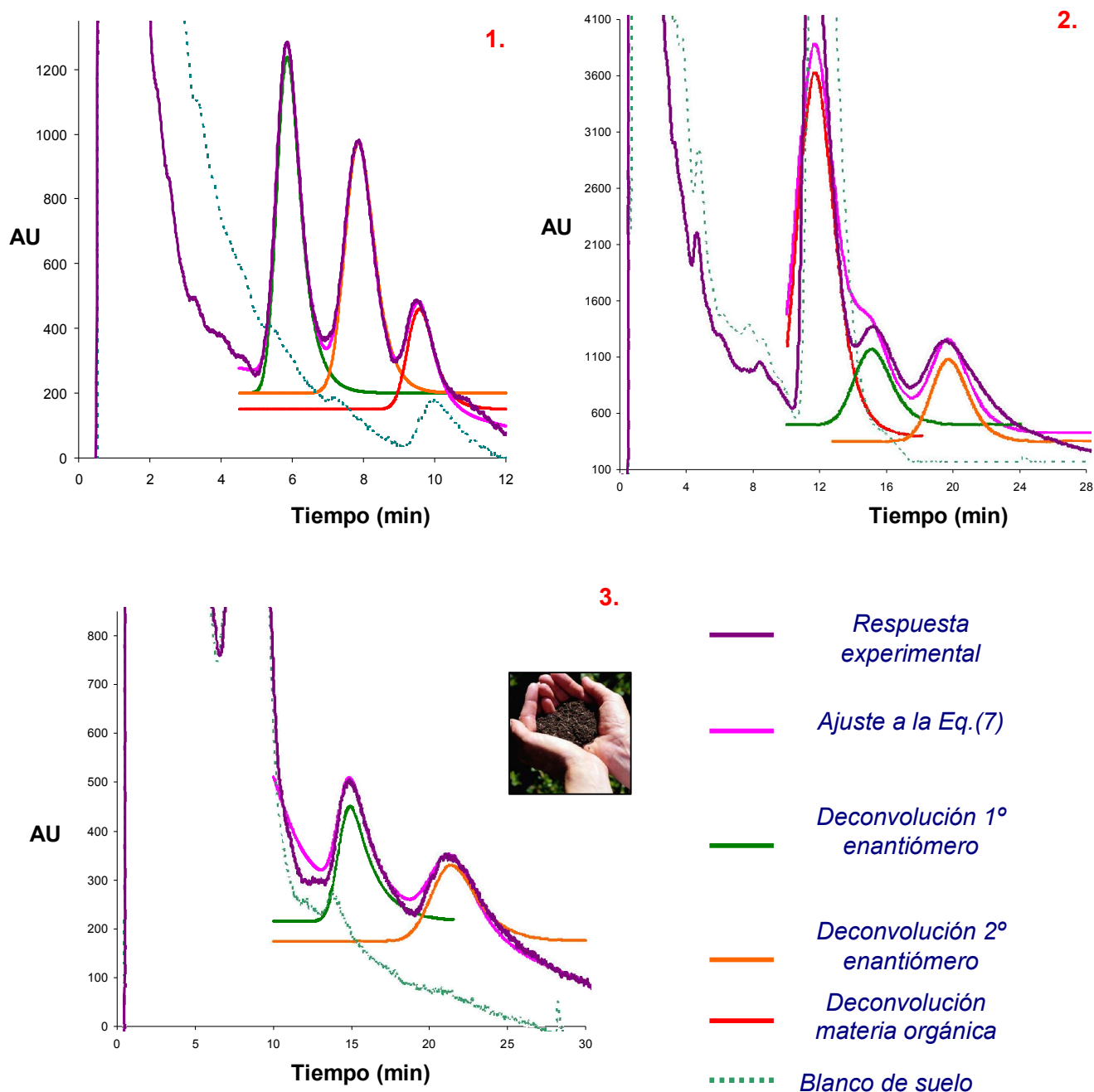


Figura 28. Cromatograma de la deconvolución mediante la función EMG de la separación quiral de 1. mefenpyr-diethyl ($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 2. quizalofop-etil ($4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 3. fluazifop-butil ($4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), en muestras de suelos

Siguiendo el procedimiento descrito en apartado 2.1.2. de la parte experimental, los cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de suelo enriquecidas tanto con los racémicos de los tres herbicidas estudiados como con diferentes proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-) del fluazifop-butil y quizalofop-etil, se trataron mediante el software de deconvolución ajustándose a una función EMG, obteniendo en todos los casos coeficientes de correlación mayores al 97.7 %. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 28, donde se puede observar que en el caso del mefenpyr-dietil (figura 28.1) y quizalofop-etil (figura 28.2) el primer enantiómero y el segundo respectivamente, aparecen solapados parcialmente con otro pico correspondiente a materia endógena de la propia matriz. En estos casos, los picos correspondientes a la materia endógena que podrían influir en el cálculo del área también fueron sometidos al tratamiento matemático de deconvolución con el fin de poder estimar correctamente el área de cada uno de los enantiómeros. Una vez deconvolucionados todos los cromatogramas, se integró el área de los enantiómeros calculando la resolución enantiomérica, la ER y el EF, comparándose después con los valores obtenidos mediante el método de la caída de calle (VDM).

Tabla 38 Parámetros cromatográficos obtenidos en el análisis de muestras de suelos

Herbicida	R/S	Añadido ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Rs ($\pm \text{IC}^a$)		ER ($\pm \text{IC}^a$) ^b		EF ($\pm \text{IC}^a$) ^c		
			VDM	EMG	VDM	EMG	VDM	EMG	valor teórico
fluazifop-butil	50:50	2.5	1.5 \pm 0.1	1.70 \pm 0.05	1.7 \pm 0.2	1.00 \pm 0.02	0.63 \pm 0.05	0.50 \pm 0.01	0.50
	50:50	4.0	1.3 \pm 0.1	1.35 \pm 0.02	1.2 \pm 0.1	1.07 \pm 0.03	0.61 \pm 0.06	0.52 \pm 0.02	0.50
	50:50	6.0	1.2 \pm 0.1	1.25 \pm 0.03	1.2 \pm 0.1	1.03 \pm 0.03	0.54 \pm 0.03	0.50 \pm 0.01	0.50
	80:20	9.0	0.9 \pm 0.4	1.17 \pm 0.03	-	-	0.73 \pm 0.02	0.79 \pm 0.01	0.80
quizalofop-etil	50:50	1.0	0.8 \pm 0.1	0.92 \pm 0.04	0.7 \pm 0.1	0.93 \pm 0.04	0.42 \pm 0.05	0.48 \pm 0.03	0.50
	50:50	2.5	0.8 \pm 0.1	0.87 \pm 0.03	0.6 \pm 0.1	1.07 \pm 0.03	0.39 \pm 0.05	0.52 \pm 0.02	0.50
	50:50	4.0	0.7 \pm 0.1	0.80 \pm 0.01	0.6 \pm 0.1	1.00 \pm 0.01	0.39 \pm 0.07	0.50 \pm 0.01	0.50
	80:20	4.0	0.9 \pm 0.1	0.90 \pm 0.05	-	-	0.30 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.20
	90:10	9.0	1.3 \pm 0.1	1.23 \pm 0.08	-	-	0.08 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.10
mefenpyr-dietil	50:50	0.5	1.5 \pm 0.1	1.58 \pm 0.05	1.4 \pm 0.2	1.03 \pm 0.02	0.58 \pm 0.08	0.53 \pm 0.02	0.50
	50:50	1.5	1.3 \pm 0.1	1.36 \pm 0.03	1.2 \pm 0.1	1.02 \pm 0.01	0.53 \pm 0.07	0.50 \pm 0.01	0.50
	50:50	2.5	0.8 \pm 0.2	0.94 \pm 0.02	1.4 \pm 0.1	1.07 \pm 0.03	0.59 \pm 0.05	0.51 \pm 0.01	0.50

^a nivel de confianza al 95%, n=3

^b según la ecuación 8, ER para racematos es 1. Para distintas proporciones enantiomérica R/S puede variar de 0 a infinito.

^c según la ecuación 9, EF puede variar de 0 a 1 según la proporción enantiomérica.

* Concentración total de racemato añadida.

Como se observa en la tabla 38, los resultados parecen estar en concordancia en el estudio de disoluciones estándar. En este caso, los valores de enantioresolución obtenidos mediante ambos métodos de integración son bastante similares. Sin embargo, el test t de Student de comparación de medias de dos series reveló diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % en los valores de ER y EF obtenidos mediante la integración VDM y EMG. Los valores de ER obtenidos mediante el método de la caída de valle están en el intervalo comprendido entre 0.65-1.70, mientras que los de EF oscilaron entre 0.39-0.63, obteniéndose intervalos de confianza entre 0.03 y 0.2. Por otra parte, los valores de ER y EF obtenidos a partir de la integración de picos deconvolucionados estuvieron más próximos a los correspondientes a los teóricos para mezclas racémicas ($ER=1$ y $EF=0.5$) obteniéndose además mejores intervalos de confianza comprendidos entre 0.01 y 0.04. Del mismo modo, los cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de suelo enriquecidas con distintas proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-) del fluazifop-butil y quizalofop-etil se trataron mediante el software de deconvolución ajustándose a una función EMG. Tal y como se puede comprobar en la tabla 38, los valores de EF obtenidos mediante integración con herramientas de deconvolución son más próximos a los que teóricamente se obtienen mediante la ecuación [6] que aquellos obtenidos mediante la integración manual de los picos, por tanto se demuestra que la integración de picos mediante herramientas de deconvolución es una alternativa eficaz en el análisis quiral de compuestos en muestras complejas.

▪ Características analíticas de la determinación de los enantiómeros del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en muestras de suelo

Una vez optimizado el tratamiento de muestra, se ha procedido al estudio de las características analíticas del método propuesto para la extracción con ultrasonidos de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos del suelo y su posterior determinación. El análisis de los extractos mediante LC quiral se ha realizado según el procedimiento 2.1.2. de la parte experimental bajo las condiciones óptimas especificadas en la tabla 27. Para obtener los límites de detección, cuantificación y el intervalo lineal de calibración, se han añadido cantidades crecientes de cada uno de los herbicidas sobre los extractos obtenidos tras el tratamiento de 1 gramo de suelo.

Las características analíticas del método aplicado a las muestras de suelo se resumen en la tabla 39.

Tabla 39. Características analíticas de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos a los niveles adicionados en extractos de 1g de suelo.

Herbicida	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)		LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Intervalo lineal ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
	1°	2°	1°	2°	
fluazifop- butil	0.469	0.563	1.563	1.875	4-15
quizalofop- etil	0.115	0.098	0.384	0.326	0.8-5.0
mefenpyr- dietil	0.047	0.056	0.155	0.187	0.4-3.0

^a concentración total de herbicida, n=5

En los resultados mostrados en la tabla anterior, se puede observar que los límites de detección alcanzados para los extractos de suelo varían entre 0.047 y 0.563 $\mu\text{g g}^{-1}$ y los de cuantificación entre 0.155 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 1.875 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el primer enantiómero del mefenpyr-dietil y segundo enantiómero del fluazifop-butil respectivamente. Se ha obtenido buena linealidad en el intervalo de concentraciones. Los enantiómeros del mefenpy-dietil, han mostrado buena linealidad en el intervalo de de 0.20-1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los enantiómeros del mefenpyr-dietil y entre 2-7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.4-2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los del fluazifop-butil y quizalofop-etil respectivamente, obteniendo en todos los casos coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.9771.

▪ **Estudio de recuperaciones en muestras de suelo enriquecidas con los herbicidas.**

Con el fin de evaluar la eficacia y la aplicabilidad de la metodología de extracción propuesta se llevó a cabo un estudio de recuperaciones añadiendo distintas cantidades de los herbicidas estudiados sobre 1 g de suelo para obtener concentraciones finales de racemato iguales a los especificados en la tabla 38. Por otra parte, algunas muestras de suelo se enriquecieron de igual manera con distintas proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-) del fluazifop-butil y quizalofop-eril, calculando del mismo modo las recuperaciones obtenidas. La tabla 40 muestra las recuperaciones obtenidas en los estudios realizados sobre muestras de suelo. Como se aprecia en dicha tabla, las recuperaciones obtenidas están comprendidas en el intervalo 71-94 %. Las mayores recuperaciones se han alcanzado al nivel más alto de adición, aunque para el mefenpyr-dietil han sido similares a todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 40. Recuperaciones de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos a los niveles adicionados en extractos de 1g de suelo.

Herbicida	R/S	Añadido ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	Recuperación (%) ^b (\pm RSD)	
			1°	2°
fluazifop-butil	50:50	2.5	74 \pm 4	71 \pm 3
	50:50	4.0	77 \pm 2	75 \pm 4
	50:50	6.0	85 \pm 2	83 \pm 3
	80:20	9.0	91 \pm 2	88 \pm 5
quizalofop-etil	50:50	1.0	76 \pm 2	74 \pm 3
	50:50	2.5	79 \pm 4	82 \pm 2
	50:50	4.0	86 \pm 1	90 \pm 1
	80:20	4.0	83 \pm 2	94 \pm 1
	90:10	9.0	87 \pm 3	96 \pm 2
mefenpyr-dietil	50:50	0.5	84 \pm 6	84 \pm 6
	50:50	1.5	90 \pm 4	88 \pm 2
	50:50	2.5	94 \pm 1	91 \pm 1

^a concentración total de herbicida, ^b n=3

Las RSD obtenidas se encuentran entre 1-6% para todos los niveles estudiados y para todas las proporciones enantioméricas R-(+)/ S-(-), demostrando la eficacia del procedimiento de extracción desarrollado para una matriz tan compleja como el suelo, sin necesidad de un tratamiento de limpieza posterior. Cabe destacar, que en caso del quizalofop-etil y fluazifop-butil, las recuperaciones obtenidas para el enantiómero R-(+) (segundo enantiómero y primer enantiómero respectivamente) son ligeramente superiores a las del enantiómero S-(-), resultados que parecen estar de acuerdo con lo recogidos por Gu y col. (141), quienes sugieren que en el caso de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, en suelos, siempre existe una ligera transformación del enantiómero R-(+) al S-(-).

Por tanto, el empleo de la cromatografía quiral directa mediante el uso de una CSP basada en una α_1 -glicoproteína ácida, combinada con la integración basada en herramientas de deconvolución y un procedimiento de extracción suave en ultrasonidos, han permitido la determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos (quizalofop-etil y fluazifop-butil) y de tipo protector (mefenpyr-dietil) de forma independiente a los niveles de aplicación usuales de estos herbicidas en suelos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

I.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA SIMULTANEA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP METIL MEDIANTE HPLC quiral DIRECTA UNIDIMENSIONAL.

La superficie de respuesta experimental obtenida partir del diseño experimental para separar los enantiómeros del diclofop-ácido (figura 23.1) muestra que en general las fases móviles con alta concentración de tampón fosfato, baja proporción de modificador orgánico y pH 7, proporcionan valores de resolución aceptables en tiempos de análisis razonables, mientras que en el caso del diclofop-metil (figura 23.2), esto mismo ocurre con fases móviles con baja concentración de tampón fosfato, baja proporción de modificador orgánico y pH 7. Por tanto, no existe una situación de compromiso en la que se pueda llevar a cabo la separación enantiomérica simultánea de ambos herbicidas mediante elución en modo isocrático para obtener una resolución enantiomérica aceptable. En las condiciones optimizadas para la separación enantiomérica del diclofop-ácido los enantiómeros del diclofop-metil quedan fuertemente retenidos en la columna y no son eluidos, incluso después de 50 minutos de análisis (fig. 29.1). Por el contrario en las condiciones óptimas para la separación enantiomérica del diclofop-metil, los enantiómeros del diclofop-ácido eluyen rápidamente sin que se produzcan las suficientes interacciones con la CSP y por tanto la enantioresolución es nula la (fig. 29.2). Por tanto, y puesto que la determinación simultánea de los enantiómeros de ambos herbicidas no es posible usando una misma fase móvil, se probaron diferentes gradientes de elución.

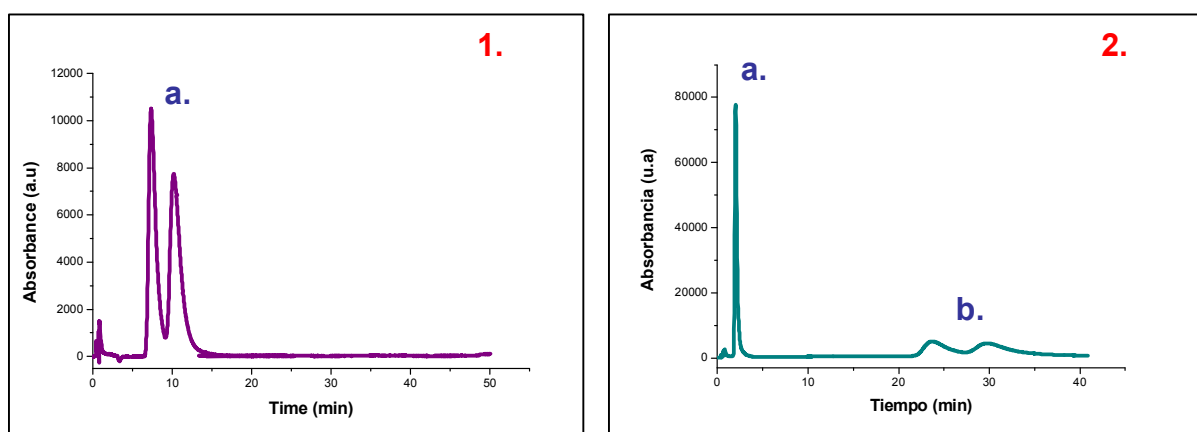


Figura 29. Cromatogramas de la separación quiral de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de diclofop-ácido y diclofop-metil

1. 2-propanol-tampón fosfato 70 mM pH 7 (0.5:99.5, v/v):
2. 2-propanol-tampón fosfato 30 mM pH 7 (9:91, v/v):

a. Enantiómeros del diclofop-ácido
b. Enantiómeros del diclofop-metil.

En todos ellos el cambio de fase móvil comenzó o bien a los 7 min, tiempo en el cual los enantiómeros del diclofop-ácido comenzaban a separarse, o en un tiempo en el cual la enantioseparación de dicho herbicida hubiese concluido. En la tabla 41 se recogen las condiciones de los gradientes ensayados y en la tabla 42 los resultados obtenidos para estos gradientes, evaluados en función de la resolución entre enantiómeros, valor de la relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF).

Cabe destacar que en todos los gradientes ensayados se producía un aumento en la anchura de pico de los enantiómeros del diclofop-metil, aumentaba ligeramente la retención produciendo, por tanto, una disminución de la sensibilidad y un aumento de la resolución enantiomérica con respecto a las determinaciones de los enantiómeros de cada herbicida de forma independiente. Este efecto es debido principalmente a que el tiempo de equilibrado de la columna quiral con la fase móvil del diclofop-metil no es muy elevado (requiriéndose en condiciones normales unos 30 minutos) resultando insuficiente para conseguir una buena línea base y una óptima estabilización de la α 1-glicoproteína ácida adecuada para separar los enantiómeros de dicho herbicida.

Tabla 41. Condiciones de los gradientes de elución ensayados.

Gradiente 1	Tiempo (min)	% A	% B
1	0-7	100	0
2	7-17	10%·min ⁻¹	
3	17-55	0	100
Gradiente 2	Tiempo (min)	% A	% B
1	0-7	100	0
2	7-12	20%·min ⁻¹	
3	12-60	0	100
Gradiente 3	Tiempo (min)	% A	% B
1	0-14	100	0
2	14-70	0	100
Gradiente 4	Tiempo (min)	% A	% B
1	0-7	100	0
2	7-22	6%·min ⁻¹	
3	22-70	0	100

A: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-ácido: 0.5% 2-propanol, tampón fosfato 70 mM pH 7.
B: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-metil: 9% 2-propanol, tampón fosfato 30 mM, pH 7.

Tabla 42. Resultados cromatográficos de los gradientes de elución ensayados.

Gradiente	<i>diclofop-ácido</i>			
	t_{r2}' (min)	R_s	ER	EF
1	8.99	1.24	1.30	0.56
2	9.05	1.25	1.10	0.52
3	9.84	1.39	1.05	0.50
4	9.87	1.30	1.30	0.56
<i>diclofop-metil</i>				
1	43.20	1.05	1.20	0.55
2	46.05	1.22	0.99	0.48
3	56.42	1.31	1.05	0.51
4	51.22	1.16	1.10	0.53

A la vista de los resultados obtenidos, se puede comprobar que el gradiente que proporcionaba valores de relación enantiomérica y fracción enantiomérica más próximos a 1 y 0.5 respectivamente y a la vez resoluciones más altas para ambos herbicidas es el gradiente en un solo paso (número 3), en el cual, al minuto 14 se cambia la fase móvil de separación enantiomérica del diclofop-ácido por la correspondiente a la separación de los enantiómeros del diclofop-metil. En la figura 30 se muestra un cromatograma obtenido con el gradiente de elución de un solo paso.

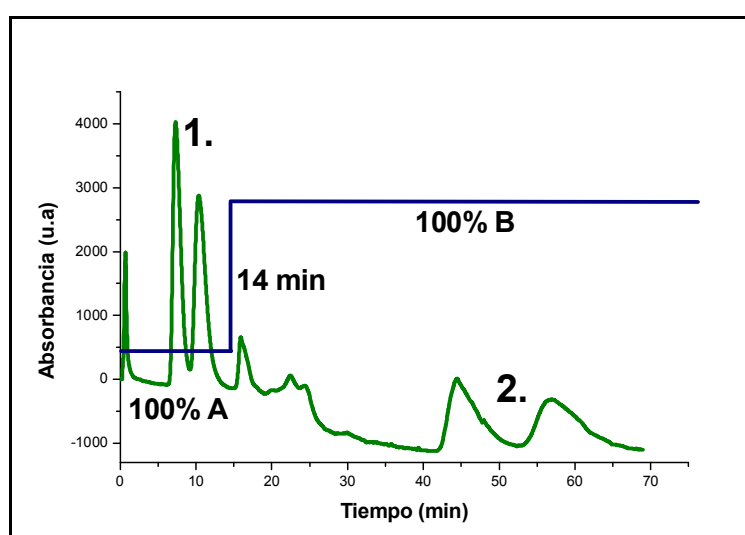


Figura 30. Cromatograma de la separación quiral de 10 mg·L⁻¹ de 1. diclofop-ácido y 2. diclofop-metil recogidos bajo las condiciones especificadas en la tabla 28

A: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-ácido
B: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-metil

I.4.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Las características analíticas del método cromatográfico de separación quiral simultánea unidimensional del diclofop-ácido y diclofop-metil, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo lineal, se establecieron bajo las condiciones óptimas de gradiente especificado en la tabla 41 siguiendo el procedimiento especificado en el apartado 2.1.3. de la parte experimental. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la relación enantiomérica y fracción enantiomérica en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón con una concentración de $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Se han realizado 3 réplicas en el mismo día ($n=3$) durante tres días consecutivos ($N=9$). En la tabla 43 se recogen las características analíticas del método optimizado.

Tal y como se observa en los resultados mostrados en dicha tabla, se observa buena linealidad en los intervalos estudiados para los enantiómeros de ambos herbicidas, entre $0.25\text{-}50.0 \text{ mg L}^{-1}$ para los del diclofop-ácido y $0.50\text{-}50.0 \text{ mg L}^{-1}$ para los del diclofop-metil, con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0.9899 y 0.9980. Los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero fueron menores o iguales a 0.150 mg L^{-1} y 0.500 mg L^{-1} respectivamente. Además, se puede comprobar que los límites de detección y cuantificación de los enantiómeros del diclofop-ácido, son similares a los obtenidos en la separación cromatográfica quiral de dicho herbicida de manera individual. Sin embargo en el caso del diclofop-metil, se aprecia pérdida de sensibilidad con respecto a la separación enantiomérica de dicho herbicida, debido posiblemente a que la columna todavía no ha alcanzado la estabilidad tras el cambio de fase móvil durante el gradiente aplicado. Como se puede observar la reproducibilidad en el día fue inferior al 3 %, y 2 % con respecto a la relación enantiomérica, y fracción enantiomérica respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores estimados del 2 % tanto para la ER como para la EF. Del mismo modo, los valores de ER y EF obtenidos son similares a los obtenidos teóricamente para mezclas racémicas según las ecuaciones [5] y [6] respectivamente.

De este modo, se ha puesto de manifiesto la eficacia y buena la precisión del método de separación quiral simultánea mediante elución en gradiente para el diclofop-metil y su principal producto de degradación diclofop-ácido, el cual permite obtener además buena sensibilidad para todas las formas enantioméricas.

Tabla 43. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de los racematos del diclofop-ácido, diclofop-metil mediante cromatografía quiral directa unidimensional

Herbicida	Linealidad			LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)		Precisión mismo día (±RSD)		Precisión entre días (±RSD)	
	Concentración (mg L ⁻¹)*	R ²		1°	2°	1°	2°	ER	EF	ER	EF
		1°	2°								
diclofop-ácido	0.25-50	0.9980	0.9960	0.03	0.03	0.10	0.12	1.02 ± 0.01	0.50 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.50 ± 0.02
diclofop-metil	0.50-50	0.9920	0.9960	0.14	0.15	0.45	0.50	1.00 ± 0.03	0.49 ± 0.02	1.04 ± 0.01	0.50 ± 0.02

1° y 2° hacen referencia al primer y segundo enantiómero eluido respectivamente (n=7).

* referido a cada enantiómero

I.4.2. DETERMINACIÓN QUIRAL UNIDIMENSIONAL DEL DICLOFOP-METIL Y DICLOFOP-ÁCIDO EN UN PREPARADO COMERCIAL

El método de separación quiral unidimensional anteriormente estudiado, se aplicó al análisis del diclofop-ácido y diclofop-metil en un herbicida comercial siguiendo el procedimiento descrito en 2.1.4. de la parte experimental. SIROFOP® es un preparado ampliamente utilizado en la agricultura (8), caracterizado por su matriz compleja formada por un disolvente orgánico (no especificado por el fabricante) y un líquido emulsionable. El producto se utiliza para el control de avena silvestre, mijo silvestre, y otras malezas anuales en cultivos de trigo, cebada, remolacha y cuyo componente activo, según la información suministrada por el fabricante es el diclofop-metil (en una concentración nominal del 36 %p/v). Tal y como se comentó en los antecedentes, los ésteres de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos se degradan fácilmente a su forma ácida, por lo que este producto también podría contener pequeñas cantidades de diclofop-ácido.

La separación cromatográfica quiral unidimensional, se aplicó al análisis de muestras de SIROFOP® preparadas según el procedimiento 2.1.4., descrito en la parte experimental. A partir del producto comercial concentrado se realizó una dilución con metanol 1/100, obteniendo una concentración aproximada de diclofop-metil de 3600 mg·L⁻¹. De esta disolución madre, se preparó una dilución 1/20 de concentración de diclofop-metil próxima a 180 mg·L⁻¹. A partir de esta disolución intermedia, se prepararon disoluciones de SIROFOP® con un contenido aproximado de diclofop-metil (expresado como racemato) del orden de 2, 4 y 8 mg·L⁻¹, realizando un total de 6 réplicas a cada nivel. Los resultados de dichos análisis se muestran en la tabla 44 y en la tabla 45 los valores de relaciones y fracciones enantioméricas obtenidos

Tabla 44. Resultados del análisis quiral unidimensional simultáneo de muestras de SIROFOP®

Nivel de concentración aproximado de diclofop-metil	2 mg·L ⁻¹		4 mg·L ⁻¹		8 mg·L ⁻¹	
Concentración encontrada de diclofop-metil	1°	2°	1°	2°	1°	2°
	0.97±0.02	0.88±0.03	1.82±0.05	1.72±0.06	4.13±0.05	4.88±0.06

* Intervalo para un nivel de confianza del 95%
1° y 2° se refieren al primer y segundo enantiómero respectivamente

Tabla 45. Descriptores quirales utilizados en el análisis quiral unidimensional simultáneo de muestras de SIROFOP®

Descriptor Quiral	ER ± IC* (VDM)	EF ± IC (VDM)	ER ± IC* (VDM)	EF ± IC (VDM)	ER ± IC (VDM)*	EF ± IC (VDM)
Nivel de concentración	2 mg·L ⁻¹		4 mg·L ⁻¹		8 mg·L ⁻¹	
diclofop-ácido	0.76 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.84±0.02	0.45 ± 0.01	0.90±0.03	0.47 ± 0.02
diclofop-metil	0.98 ± 0.01	0.49 ± 0.01	1.02±0.01	0.50 ± 0.01	1.03±0.04	0.51 ± 0.01

* Intervalo para un nivel de confianza del 95%

Tal y como se observa en los resultados mostrados en las tablas 44 y 45, la muestra contenía pequeñas cantidades de diclofop-ácido. Los valores de ER obtenidos para el diclofop-ácido a todos los niveles de concentración se encuentran comprendidos entre 0.76 y 0.90, mientras que para la EF se encuentran en un intervalo de 0.42-0.47, en ambos casos valores alejados a los típicos de mezclas racémicas (1 y 0.5 respectivamente). Esta diferencia de valores podía deberse a la influencia de un intenso pico que aparece a un tiempo de retención de 7 min (fig 31.), el cual solapa parcialmente con el primer enantiómero eluido del diclofop-ácido, dificultando el análisis quiral de dicho herbicida en la muestra.

Por este motivo, y al igual que en caso del análisis del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en suelos, se aplicaron las herramientas de deconvolución con el fin de comprobar si el cálculo de los descriptores quirales ER y EF se mejoraba para el caso del diclofop-ácido. Para ello, los cromatogramas obtenidos se trataron siguiendo el mismo procedimiento al especificado en el apartado 2.1.1. de la parte experimental, obteniendo en todos los casos coeficientes de correlación mayores al 99 %. Los valores de ER y EF se recalcularon (tabla 45) con los datos de las áreas de pico cromatográfico obtenidos mediante el uso de la función matemática EMG. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 46.

En la figura 31 se muestra un cromatograma de la separación enantiomérica quiral unidimensional simultánea para una muestra de SIROFOP® que contenía una concentración aproximada de diclofop-metil de 30 mg·L⁻¹ así como la deconvolución de los enantiómeros de ambos herbicidas. Al igual que en el caso del análisis del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, los valores de ER y EF obtenidos mediante integración con herramientas de deconvolución, son más próximos a los que

corresponderían a una mezcla racémica que aquellos obtenidos mediante la integración manual de los picos.

Tabla 46. Resultados del análisis quiral unidimensional simultáneo de muestras de SIROFOP® mediante herramientas de deconvolución

Descriptor Quiral	ER ± IC* (EMG)	EF ± IC (EMG)	ER ± IC* (EMG)	EF ± IC (EMG)	ER ± IC* (EMG)	EF ± IC (EMG)
Nivel de concentración	2 mg·L ⁻¹		4 mg·L ⁻¹		8 mg·L ⁻¹	
diclofop-ácido	0.99 ± 0.02	0.48 ± 0.02	1.00±0.02	0.49 ± 0.01	1.00±0.02	0.50 ± 0.02
diclofop-metil	1.00 ± 0.01	0.49 ± 0.01	1.00±0.01	0.50 ± 0.01	1.01±0.01	0.50 ± 0.01

* Intervalo para un nivel de confianza del 95%

El test t de Student de comparación de medias de dos series reveló diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % en los valores de ER y EF obtenidos mediante la integración VDM y EMG únicamente en el caso del diclofop-ácido. Estos estudios, por tanto demuestran la utilidad de la integración de picos mediante herramientas de deconvolución cuando la matriz de la muestra es tan compleja que, componentes de la misma, pueden interferir en la determinación del analito de interés.

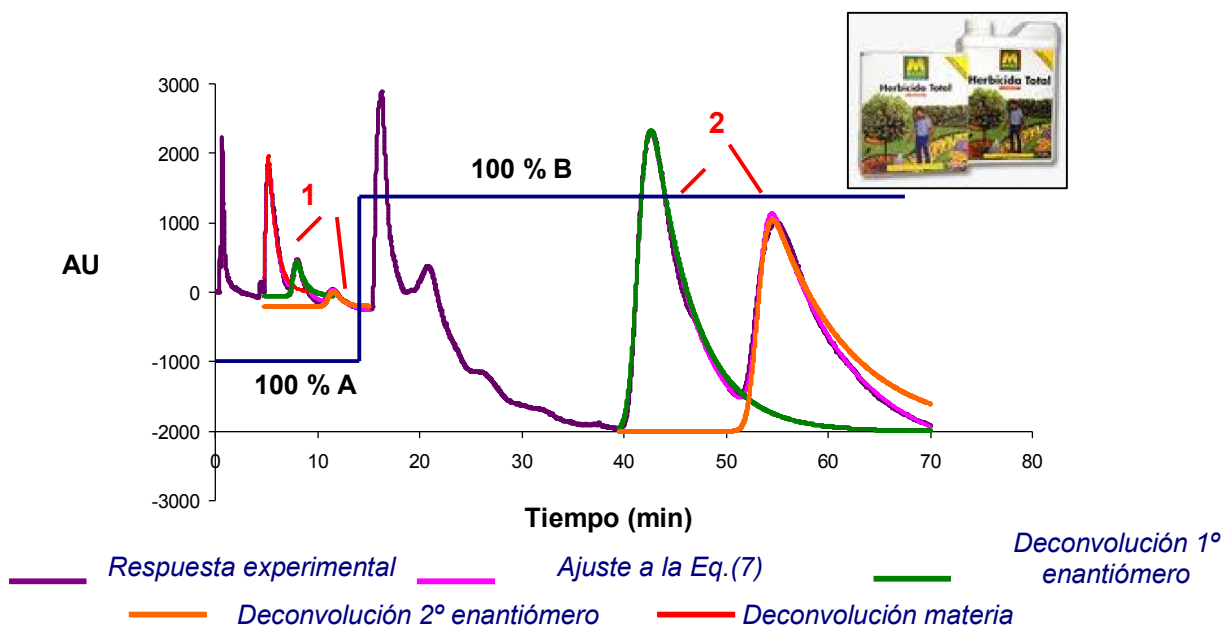


Figura 31. Cromatograma de la separación quiral de una muestra de SIROFOP® de 1. diclofop-ácido y 2. diclofop-metil recogidos bajo las condiciones especificadas en la tabla 41
 A: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-ácido
 B: Fase móvil separación enantiomérica diclofop-metil

I.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL HPLC aquiral – HPLC quiral

Los estudios anteriores muestran que la materia endógena propia de las muestras puede interferir con la determinación de los enantiómeros de los herbicidas estudiados. Es en estos casos cuando los acoplamientos bidimensionales HPLC aquiral-HPLC quiral parecen ser la alternativa más idónea para el análisis de compuestos quirales en muestras complejas. La posibilidad de un acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral requiere establecer condiciones de separación ortogonales para los sistemas cromatográficos a acoplar, por lo que en primer lugar, es necesario estudiar las condiciones de separación de los herbicidas objeto de estudio en la columna primaria. Una de las opciones más adecuadas según se puede ver en el apartado de antecedentes, es la utilización de la separación cromatográfica en fase inversa.

I.5.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PRIMARIA DE AMBOS HERBICIDAS

Con el fin de llevar a cabo un posterior acoplamiento cromatográfico de tipo HPLC aquiral-HPLC quiral, se tuvieron en cuenta varios aspectos a la hora de realizar la optimización de la separación primaria de ambos herbicidas mediante cromatografía en fase inversa:

1. **Compatibilidad de las fases móviles entre columnas:** Este aspecto es uno de los más importantes a tener en cuenta. Puesto que las separaciones quirales tanto del diclofop-ácido y diclofop-metil se llevan a cabo en fases móviles altamente acuosas, la separación en la columna primaria se debe llevar a cabo en un medio altamente polar. Por tanto y basándose en la experiencia previa del grupo de investigación se utilizó una columna C₁₈-LUNA escogiendo fases móviles que contuviesen distintas proporciones de metanol y tampón fosfato 30 mM (por similitud a las fases móviles utilizadas en las separaciones quirales optimizadas, y por tanto aseguramiento de la compatibilidad de las fases móviles). Se decidió fijar esta concentración por similitud a la fase móvil optimizada en el caso del diclofop-metil, ya que la determinación de este herbicida presenta una menor sensibilidad que la del diclofop-ácido. Se

estudiaron varios pH (6.0, 6.5 y 7.0), observándose que a medida que aumentaba el pH los tiempos de retención de ambos herbicidas aumentaban.

2. **Tiempo de separación entre picos:** El intervalo de tiempo entre la elución de los dos herbicidas en la columna primaria debe ser lo suficientemente amplio como para permitir la elución de los enantiómeros del diclofop-ácido en la columna quiral, una posterior estabilización de la CSP con la fase móvil correspondiente al diclofop-metil y por último llevar a cabo la separación enantiomérica de este último herbicida a la hora de realizar el acoplamiento bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral. Por este motivo, se ensayaron distintas fases móviles con proporciones de metanol de 70%, 75% y 80%, comprobándose que a medida que se disminuía la proporción de metanol, la separación entre los dos picos era mayor, aumentando por otra parte el tiempo de análisis.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares y como la concentración de tampón fosfato parecía ser un factor poco influyente en la separación cromatográfica, se decidió fijar esta concentración en 30 mM y se optó por un diseño experimental completo de 2 factores y 3 niveles con un total de 9 experimentos, para evaluar la influencia de los factores estudiados en la separación cromatográfica de ambos herbicidas mediante cromatografía líquida de partición en fase inversa. Los factores estudiados fueron la proporción de metanol en la fase móvil y el pH del tampón fosfato 30 mM, mientras que las respuestas estudiadas fueron tanto el tiempo de retención corregido del último herbicida eluido (diclofop-metil), como la diferencia entre los tiempos de retención de ambos herbicidas en función de la fase móvil utilizada. Los intervalos donde se aplicó el diseño experimental fueron:

- Proporción de metanol de la fase móvil: 70%-80%.
- pH del tampón: 6-7.

El diseño experimental se normalizó asignando los valores -1, 0 y 1 a los niveles de cada una de las variables estudiadas. La información más importante del diseño experimental así como los valores normalizados de los factores experimentales evaluados se recogen en la tabla 47. Planteado el diseño experimental, se registraron los cromatogramas correspondientes a cada una de las 9 fases móviles ensayadas, calculando la diferencia de los tiempos de retención de ambos herbicidas y el tiempo de retención corregido correspondiente al diclofop-metil.

Tabla 47. Resultados del diseño experimental de 2 factores y tres niveles para la separación del diclofop-ácido y diclofop-metil mediante cromatografía en fase inversa.

Exp.	Metanol (%)		pH		t_{rDM} (min)	$t_{rDM} - t_{rDA}$ (min)
1	70	-1	6.00	-1	16.77	11.87
2	75	0	6.00	-1	15.58	11.12
3	80	1	6.00	-1	14.52	11.37
4	70	-1	6.50	0	23.02	16.52
5	75	0	6.50	0	21.49	17.14
6	80	1	6.50	0	20.21	17.09
7	70	-1	7.00	1	27.09	20.31
8	75	0	7.00	1	25.24	20.80
9	80	1	7.00	1	22.62	19.59

Mediante los resultados obtenidos en las condiciones de los diseños experimentales planteados, se obtuvieron las ecuaciones que definían las superficies de respuesta experimental. El análisis de los diseños se realizó mediante el programa estadístico **STATGRAPHICS PLUS Versión 5.0**. Así, la variación de la diferencia de tiempos de retención de ambos herbicidas y del tiempo de retención corregido de éste último en función de los factores estudiados se ajustó a una ecuación polinómica de segundo grado del siguiente tipo:

Ec. [12]

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_1^2 + a_4x_1x_2 + a_5x_2^2$$

Dónde:

x_1 = proporción de metanol en la fase móvil.

x_2 = pH del tampón fosfato 30 mM.

y = diferencia de tiempos de retención de ambos herbicidas y tiempo de retención corregido del diclofop-metil.

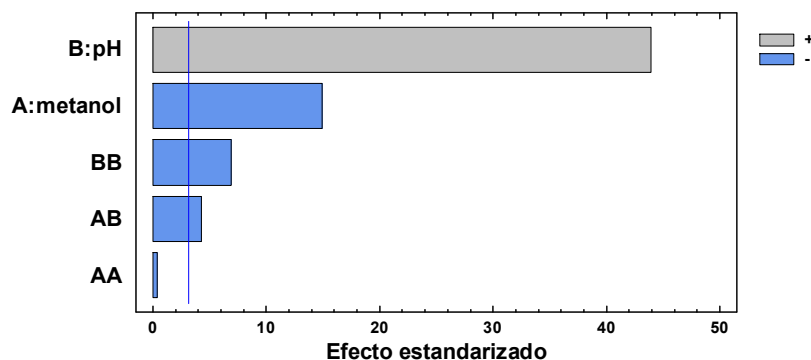
En la tabla 48, se muestran los valores de los coeficientes experimentales obtenidos (a_0 - a_5) en los ajustes realizados para cada uno de los herbicidas, así como los coeficientes de correlación múltiple (R^2) de los modelos, los valores de probabilidad (valores-P) y los errores de estimación estándar (SEE).

Tabla 48. Coeficientes de ajuste experimentales obtenidos en el modelo matemático según la ecuación 12, para la separación cromatográfica primaria del diclofop-metil y su metabolito

Parámetro	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	R^2	SEE
$t_{rDM} - t_{rDA}$	17.06	-0.11 0.0009	4.39 0.0186	-0.23 0.1276	-0.05 0.0673	-1.07 0.4576	99	0.60
t_{rDM}'	21.61	-1.58 0.6886	4.68 0.0004	-0.06 0.6283	-0.55 0.8664	-1.27 0.0857	99	0.26

A la vista de los resultados mostrados en la tabla anterior, se observa que los valores del coeficiente de correlación múltiple (R^2) obtenidos indican que los modelos matemáticos explican el 99 % de la variabilidad en las respuestas estudiadas. Los valores del error de estimación estándar (SEE) obtenidos en los modelos se encuentran entre 0.26-0.60. Los valores de probabilidad mostrados en la tabla anterior en cursiva y en negrita calculados a un nivel de confianza del 95 % indican el factor experimental que afecta de manera significativa a las respuestas. El gráfico de Pareto para la resolución de la figura 32, muestra el peso de cada uno de los factores.

1.



2.

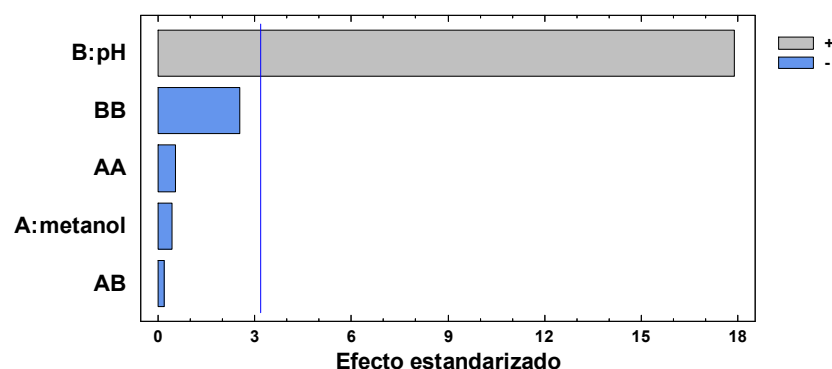


Figura 32. Gráfico de Pareto. Representación del peso de cada factor en 1. t_{rDM}' y 2. $t_{rDM} - t_{rDA}$

A la vista de estos resultados, se comprueba que el pH de la fase móvil es el factor más influyente tanto en la diferencia de tiempos de retención de ambos herbicidas como en el tiempo de retención corregido del diclofop-metil. Este factor posee un efecto positivo en ambos casos, es decir, a medida que aumenta ambas respuestas aumentan también. Con respecto al porcentaje de metanol, también resulta ser un factor influyente en el tiempo de retención corregido del diclofop-metil, sin embargo en este caso el efecto es negativo es decir, un aumento del porcentaje de modificador orgánico en la fase móvil implica una disminución en la retención de este herbicida. Cabe destacar que tanto el término cuadrático pH^2 , como el factor de cruce $\text{metanol} \times \text{pH}$ únicamente presentan un efecto negativo en el tiempo de retención corregido del diclofop-metil. A modo de ejemplo, en la figura 33 se muestra el gráfico de la superficie de respuesta estimada normalizada para la diferencia de tiempos de retención entre el diclofop-ácido y diclofop-metil.

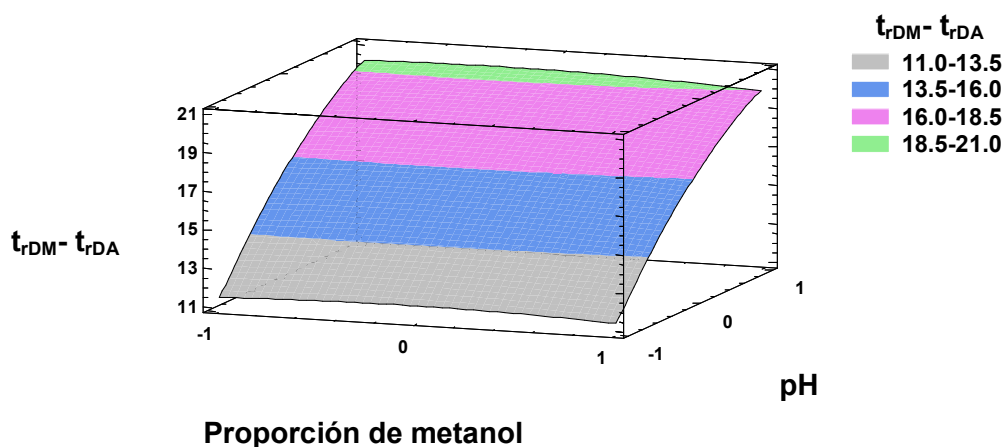


Figura 33. Mapa de superficie tridimensional obtenido en el diseño experimental realizado con una concentración de tampón fosfato 30 mM.

Esta superficie de respuesta muestra que en general, a los valores de pH más altos estudiados y a cualquier proporción de modificador orgánico en la fase móvil proporcionan una diferencia de tiempos de retención entre el diclofop-ácido y diclofop-metil suficientes como para permitir realizar las transferencias de cada uno de los picos cromatográficos a la columna quiral.

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de separación se utilizó el análisis multirespuesta como herramienta de optimización, seleccionando como criterio que la fase móvil debía proporcionar una diferencia entre los tiempos de retención del

diclofop-ácido y diclofop-metil suficiente para permitir la separación de los enantiómeros del diclofop-ácido en la columna quiral, cambiar la fase móvil a la fase correspondiente a la separación de los enantiómeros del diclofop-metil y estabilizar de nuevo la columna para realizar la transferencia y separación de los enantiómeros de este último herbicida, implicando unos tiempos de análisis no excesivamente largos. Llegando a un compromiso entre los dos factores evaluados, finalmente se escogió como fase móvil una mezcla de metanol-tampón fosfato 30 mM pH 7 (73:27 v/v) realizándose los análisis bajo las condiciones especificadas en el apartado 2.2.1. de la parte experimental. La superficie de respuesta obtenida muestra que bajo estas condiciones el tiempo de análisis es razonable evitando por tanto el ensanchamiento excesivo del último pico cromatográfico, y el intervalo de tiempo entre la elución del diclofop-ácido y diclofop-metil a la hora de realizar el acoplamiento bidimensional HPLC acquiral-HPLC quiral, es suficiente para permitir la elución de los enantiómeros del diclofop-ácido en la columna quiral y la posterior estabilización de la CSP con la fase móvil correspondiente a la separación de los enantiómeros del diclofop-metil, transferencia del pico cromatográfico de éste último herbicida y por último la separación enantiomérica de sus enantiómeros.

En las condiciones seleccionadas el diclofop-ácido eluye en un tiempo de 6.90 min mientras que el diclofop-metil eluye a un tiempo de 26.60 min ($t_{r,DM} = 24.95$ min, $t_{r,DM}$ predicho = 25.05 min), con una separación entre la elución del diclofop-ácido y la del diclofop-metil de 19.70 min ($t_{r,DM} - t_{r,DA}$ predicha = 20.48 min), separación entre ambos analitos suficiente para realizar la transferencia de ambos herbicidas a la columna quiral. En la figura 34 se recoge un cromatograma registrado bajo dichas condiciones.

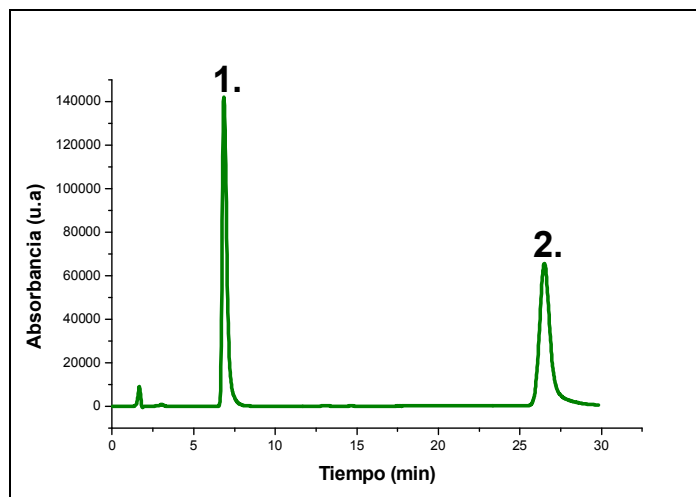


Figura 34. Cromatogramas de la separación acquiral de 20 mg·L⁻¹ de 1). diclofop-ácido y 2). diclofop-metil bajo las condiciones óptimas de separación.

I.5.2. OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL

La separación enantiomérica del diclofop-ácido y diclofop-metil mediante cromatografía líquida bidimensional HPLC quiral-HPLC quiral implica el desarrollo de una metodología que permita separar los racematos de dichos herbicidas de una mezcla compleja en una primera separación cromatográfica, utilizando las condiciones descritas en el apartado 2.2.1. de la parte experimental, para posteriormente y en un mismo análisis, separar los enantiómeros de los mismos mediante las condiciones expuestas en la tabla 47. Esta determinación se puede llevar a cabo de un modo discontinuo o de un modo continuo tal y como se mencionó en la revisión bibliográfica.

Previamente al desarrollo y optimización de dicho acoplamiento bidimensional para el diclofop-ácido y el diclofop-metil, se efectuó un ensayo de ortogonalidad y compatibilidad de las fases móviles implicadas en el acoplamiento. Para ello, se efectuó la separación quiral de los enantiómeros de dichos herbicidas según las condiciones descritas en el apartado 2.1 de la sección experimental, en disoluciones que simulaban ser una fracción eluida de la columna cromatográfica primaria (C_{18}), es decir, preparadas en la fase móvil utilizada en la separación primaria (metanol-tampón fosfato 30 mM pH 7 (73:27, v/v)). Los resultados de dichos estudios de ortogonalidad y compatibilidad se muestran en la tabla 49.

Tabla 49. Resultados del estudio de compatibilidad de fases móviles en el análisis de herbicidas.

Herbicida	Muestra	t_{r1}' (min)	t_{r2}' (min)	R_s	ER	EF
diclofop-ácido	Disolución patrón	6.94	9.72	1.40	1.00	0.50
	Inyección en la fase móvil de la separación primaria	6.91	9.62	1.39	1.04	0.50
diclofop-metil	Disolución patrón	20.64	25.22	1.20	1.02	0.50
	Inyección en la fase móvil de la separación primaria	20.33	24.93	0.90	1.11	0.52

En la figura 35 se recogen los cromatogramas obtenidos en este estudio de compatibilidad de fases móviles.

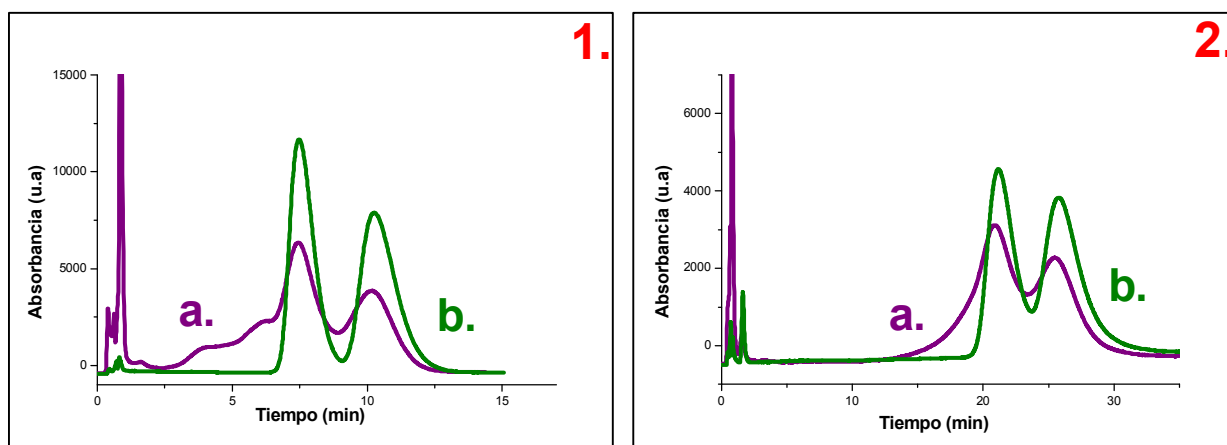


Figura 35. Cromatogramas de la separación quiral del 1.diclofop-ácido, 2. diclofop-metil en diferentes condiciones:

- a) Estudio de ortogonalidad y compatibilidad de fases móviles.*
- b) Muestra de referencia: condiciones de separación óptima de cada herbicida (tabla 27).*

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se confirmó la compatibilidad de las dos fases móviles y por lo tanto la posibilidad de separación bidimensional de ambos herbicidas. El cambio de fase móvil afecta en poca medida a la separación de los enantiómeros del diclofop-ácido y diclofop-metil, los tiempos de retención permanecen prácticamente constantes y únicamente en el caso del diclofop-metil, la resolución, la ER y la EF se ven afectadas ligeramente debido al ensanchamiento de picos. Sin embargo, sí se aprecia una pérdida de altura con respecto a la muestra de referencia y la aparición de pequeñas derivas en la línea base. Este hecho es debido principalmente al cambio de modificador orgánico y a la proporción del mismo. Las separaciones cromatográficas quirales se llevan a cabo utilizando 2-propanol como modificador orgánico y en proporciones que no superan en ningún caso el 10% (0.5% 2-propanol en el caso del diclofop-ácido y 9% en el caso del diclofop-metil), mientras que la separación cromatográfica de ambos herbicidas mediante cromatografía en fase inversa, requiere el uso de metanol como modificador orgánico y además en una proporción del 73%, lo que justificaría las pequeñas derivas que se aprecian.

Una vez comprobada la compatibilidad de las fases móviles empleadas en el acoplamiento y por tanto la posibilidad de separación bidimensional de ambos herbicidas, se optimizó, para cada uno de ellos y de forma independiente, un método de separación bidimensional. Para ello, las mezclas enantioméricas de ambos

herbicidas fueron separados en la columna primaria C_{18} según las condiciones especificadas en el apartado I.5.1 de dicha sección y el procedimiento 2.2.1. de la parte experimental. Posteriormente, y mediante la válvula de desplazamiento (figura 18) se fueron transfiriendo distintos volúmenes que contenían al correspondiente herbicida, desde la columna primaria (C_{18}) a la columna secundaria (α_1 -glicoproteína ácida), dónde ambos herbicidas fueron separados en sus dos formas enantioméricas bajo las condiciones especificadas en la tabla 27.

En el caso del diclofop-ácido, las fracciones del efluente cromatográfico que contenían el pico correspondiente al analito, comenzaron por la transferencia de 5 s de pico (83 μ L) y terminaron por la transferencia de 60 s de pico (1 mL). Dicha separación bidimensional se realizó con una disolución que contenía 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de diclofop-ácido, a un caudal de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en la columna primaria (C_{18}), y a un caudal de 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en la columna secundaria (quiral). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 50.

Tabla 50. Resultados de la separación bidimensional del diclofop-ácido

Tiempo de transferencia (s)	t_{r1}' (min)	t_{r2}' (min)	R_s	ER	EF
5	8.72	12.58	1.74	0.99	0.50
10	9.87	14.82	1.60	0.99	0.50
15	9.33	13.96	1.43	1.06	0.51
20	9.07	13.79	1.40	1.06	0.51
25	7.81	11.71	1.50	1.05	0.51
30	7.98	11.62	1.70	1.16	0.54
35	7.77	10.57	1.40	1.10	0.52
40	7.76	11.45	1.47	1.09	0.52
45	7.96	11.83	1.42	1.05	0.51
50	8.07	11.04	1.30	1.01	0.50
55	7.61	10.45	1.10	1.05	0.51
60	7.80	10.92	1.32	1.16	0.54

En todas las porciones transferidas, los valores de resolución oscilan entre 1.10 y 1.74, por tanto en todos los ensayos la pareja de enantiómeros se considera resuelta. Con respecto a la relación enantiomérica, y fracción enantiomérica, en general en todas las fracciones transferidas toma un valor en torno a la unidad y a 0.5 respectivamente, valor típico de muestras racémicas. En el caso del diclofop-metil las

fracciones del efluente cromatográfico que contenían el pico correspondiente al analito, fueron escogidas transfiriendo distintas porciones entre 83 μL (5 segundos de transferencia) y 1.16 mL (70 segundos de transferencia), ya que el pico correspondiente a dicho herbicida presentaba una anchura mayor a la del diclofop-ácido y de ahí la necesidad de transferir una mayor fracción de pico. Los datos de dicha separación bidimensional se muestran en la tabla 51.

Tabla 51. Resultados de la separación bidimensional del diclofop-metil

Tiempo de transferencia (s)	t_{r1}' (min)	t_{r2}' (min)	R_s	ER	EF
5	20.08	25.72	1.70	1.09	0.52
20	20.65	25.84	1.62	1.18	0.54
30	20.08	24.76	1.32	1.10	0.52
40	19.67	24.52	1.30	1.04	0.51
50	20.97	25.88	1.43	1.18	0.54
60	22.08	27.24	1.60	1.12	0.53
70	22.58	27.50	1.70	0.99	0.50

Los resultados obtenidos muestran que para todas las fracciones transferidas desde la columna primaria a la columna secundaria, las dos enantiómeros del herbicida son separadas con valores de resolución aceptables que oscilan entre 1.30 y 1.70 considerándose la pareja enantiomérica resuelta en todos los casos. Con respecto a los valores de la relación enantiomérica y fracción enantiomérica, al igual que en el caso del diclofop-ácido, toma en todos los casos valores próximos a la unidad y a 0.5 respectivamente.

Cabe destacar que en todos los análisis anteriores, los tiempos de retención de ambos enantiómeros y las resoluciones obtenidas son diferentes a los resultados obtenidos en los ensayos de ortogonalidad y compatibilidad de fases móviles. Por otra parte, llama la atención, que en todos los ensayos la altura de los picos disminuye de forma considerable, y por tanto, disminuye la sensibilidad respecto a los ensayos de separación quiral de ambos herbicidas llevadas a cabo de forma independiente. Posiblemente esto es debido a varias razones:

- **Diferencia de caudales en ambas dimensiones:** Las separaciones cromatográficas quirales se llevan a cabo a un caudal de $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,

mientras que la separación de los racémicos en la columna C_{18} a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. En el momento de la transferencia se produce una pérdida de estabilidad de la presión en cabeza de la columna de la segunda dimensión.

- **Cambio de modificador orgánico:** Se pasa de una fase móvil que contiene metanol como modificador orgánico en altas proporciones, a una fase móvil que contiene 2-propanol como modificador orgánico en proporciones muy bajas.
- **Compatibilidad de las dos fases móviles:** En una separación bidimensional en continuo el sistema de fases móviles utilizado en el acoplamiento debe ser totalmente compatible, tanto en miscibilidad como en la fuerza eluotrópica del disolvente. A pesar de que las fases móviles implicadas en el acoplamiento son altamente polares, la diferencia en el modificador orgánico provoca una ligera disminución en la sensibilidad del método. Por otra parte el volumen transferido es bastante mayor al inyectado en los análisis realizados de manera independiente, por lo que la fase móvil en la separación quiral se ve altamente afectada por la fase móvil de la separación primaria. Además, al girar la válvula de desplazamiento y disponer ambas columnas en serie, parte de la fase móvil utilizada en la separación quiral entra en la columna dónde se lleva a cabo la separación primaria, produciendo una desestabilización de la línea base en la misma, necesitando un tiempo suficiente de estabilización entre la elución de los picos cromatográficos en la primera columna.
- **Dilución de la muestra:** En la columna primaria, se inyectaron $20 \mu\text{L}$ de disoluciones que contiene $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del racemato de cada uno de los herbicidas. Al la hora de realizar la transferencia, el volumen transferido a la columna quiral es mayor de 0.5 mL y por tanto, se produce un efecto de dilución de muestra y por tanto una pérdida de sensibilidad apreciable en el método.

Tal y como se mencionó en la revisión bibliográfica el tiempo de transferencia desde la columna primaria (C_{18}) a la columna secundaria (quiral) es el factor más importante a tener en cuenta en los acoplamientos cromatográficos bidimensionales ya que controla la cantidad de analito transferido. Una vez que se comprobó que el acoplamiento bidimensional en continuo implicaba una ligera pérdida de sensibilidad, se evaluó el tiempo de transferencia óptimo que permitía alcanzar la máxima sensibilidad, es decir aquel tiempo que proporcionase la máxima área de pico cromatográfico para los enantiómeros de ambos herbicidas. Con este fin, se representaron las áreas de pico de cada uno de los enantiómeros del diclofop-ácido y

diclofop- metil frente al tiempo de transferencia de cada ensayo. Dichas representaciones proporcionaron curvas que se ajustaban a una función Gaussiana. El máximo de cada una de estas curvas se tomó como tiempo de transferencia óptimo. En la figura 36 se recogen las representaciones de las funciones Gaussianas obtenidas en el proceso de optimización para ambos herbicidas.

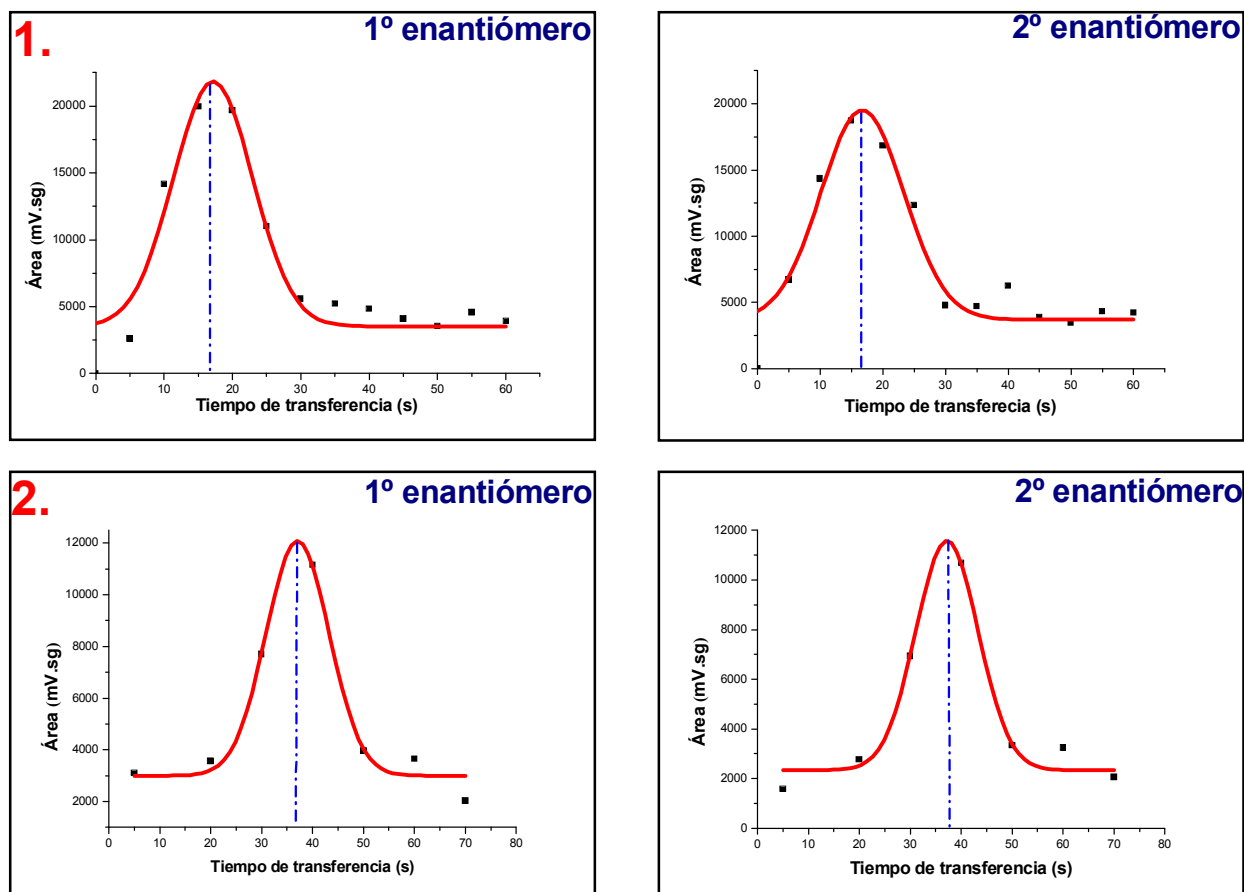


Figura 36. Representación del área de pico de cada enantiómero frente al tiempo de transferencia: 1.diclofop-ácido, 2.diclofop-metil

Mediante estos estudios se pudo comprobar que en el caso del diclofop-ácido, el máximo de la función Gaussiana corresponde con un tiempo de transferencia de 15 s (aproximadamente un volumen de transferencia de 0.25 mL), mientras que para el diclofop-metil, el máximo de la representación correspondía con tiempo de transferencia de 38 s (aproximadamente un volumen de transferencia de 0.63 mL. En la primera parte de la curva de la Gaussiana, la cantidad de muestra transferida es pequeña, mientras que en la última parte de la misma el efecto predominante es la dilución cromatográfica, de ahí que el tiempo óptimo de transferencia sea aproximadamente el máximo de la función Gaussiana.

Una vez optimizadas todas las condiciones experimentales del acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral- HPLC quiral se procedió a la separación de los enantiómeros de ambos herbicidas en continuo. Para lo cual se programó la bomba del sistema de separación quiral (fig. 16, sistema 1) para que a los 14 min (tiempo suficiente para separar los enantiómeros del diclofop-ácido) se cambiase en un solo paso la fase móvil por la optimizada para la separación de los enantiómeros del diclofop-metil. Las condiciones de dicho programa de elución y transferencia se recogen en la tabla 52.

Tabla 52. Condiciones de operación y posiciones de la válvula de desplazamiento utilizadas en la determinación quiral mediante LC-LC del diclofop-ácido y diclofop-metil

Tiempo	Canal de la Bomba 1	Posición de la válvula	Evento
-30 a 0 min	A	1	Equilibrado de la columna AGP-quiral con la fase móvil de análisis quiral del diclofop-ácido
0 min	A	1	Inyección de la muestra en sistema 2
6.9 min	A	2	Transferencia del diclofop-ácido
6.9 min + 15 s	A	1	Fin de la transferencia
14 min	B	1	Equilibrado de la columna AGP-quiral con la fase móvil de análisis quiral del diclofop-metil
27 min	B	2	Transferencia del diclofop-metil
27 min + 38 s	B	1	Fin de la transferencia
70 min	A	1	Equilibrado de la columna AGP-quiral para nuevo análisis
-	B	1	Lavado de la columna AGP con una disolución acuosa del 15 % en 2-propanol

Una vez chequeado el programa de la bomba, se procedió al análisis de la mezcla de herbicidas mediante el método optimizado. En la figura 37 se muestra el cromatograma de la separación cromatográfica mediante el acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral de una disolución patrón que contiene 20 mg·L⁻¹ del racemato de cada uno de los herbicidas estudiados. Como se puede observar el acoplamiento bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral proporciona una buena separación enantiomérica en ambos casos, similar a la predicha con los modelos matemáticos comentados en el apartado 2 de dicha sección, obteniéndose además relaciones enantioméricas y fracciones enantioméricas próximas a 1 y 0.5 respectivamente.

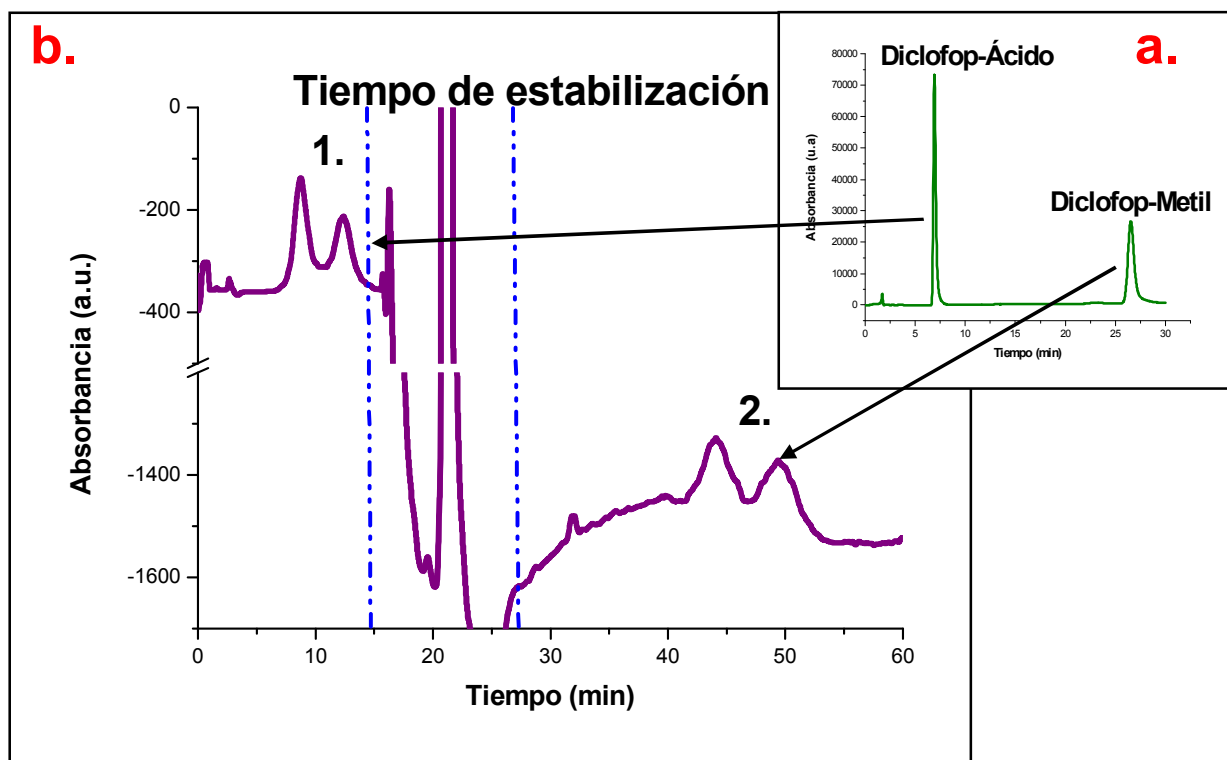


Figura 37. Cromatograma del acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral:
a) Separación en fase inversa del diclofop-ácido y diclofop metil (condiciones especificadas en el apartado 5.1 de dicha sección.
b) Separación enantiomérica del 1.) diclofop-ácido, 2.) diclofop-metil (condiciones especificadas en la tabla 27.)

En el caso del diclofop-metil la altura de los picos disminuye incluso más con respecto a la optimización de separación bidimensional en continuo de dicho herbicida de forma independiente, disminuyendo la relación señal ruido y, por tanto, disminuyendo la sensibilidad respecto a ensayos anteriores. Este hecho se debe a que la columna quiral se equilibra con la fase móvil correspondiente al diclofop-metil únicamente durante el tiempo que transcurre entre la separación quiral del diclofop-ácido y la separación cromatográfica del diclofop-metil, es decir, alrededor de 20 min, tiempo que puede resultar insuficiente para conseguir una buena estabilización de la misma.

1.5.2.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO BIDIMENSIONAL PARA EL ANÁLISIS QUIRAL DEL DICLOFOP-ÁCIDO Y DICLOFOP-METIL

Para establecer las características analíticas del acoplamiento cromatográfico HPLC quiral-HPLC quiral en la determinación quiral del diclofop-ácido y diclofop-metil límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo lineal), han tenido

en cuenta tanto las características de la separación cromatográfica primaria como las del acoplamiento en su conjunto, llevadas a cabo bajo las condiciones óptimas de separación especificadas en los apartados I.5.1 y I.5.2 de dicha sección y según los procedimientos 2.2.1. y 2.2.2. de la parte experimental. En las tablas 53 y 54 se recogen las características analíticas tanto de la separación primaria como del acoplamiento cromatográfico.

Tabla 53. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de diclofop-ácido y diclofop-metil mediante la separación cromatográfica primaria en C₁₈

Herbicida	Linealidad		LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	Precisión mismo día (RSD, %)		Precisión entre días (RSD, %)	
	Concentración (mg L⁻¹)*	R²			t_{rDM}- t_{rDA} (min)	t_r' (min)	t_{rDM}- t_{rDA} (min)	t_r' (min)
diclofop- ácido	0.25-5	0.992	0.06	0.20	2.5	1.5	3.2	3
	5-150	0.996						
diclofop- metil	5-150	0.996	0.32	1.07		1.7		3.1

* Concentración total de racemato, n=7.

En la separación cromatográfica primaria, la precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la diferencia entre los tiempos de retención del diclofop-ácido y diclofop-metil y del tiempo de retención corregido del diclofop-metil en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón con una concentración de 20 mg·L⁻¹. Se han realizado 3 réplicas en el mismo día (n= 3) durante tres días consecutivos (N= 9). Tal y como se observa en los resultados mostrados en la tabla 53, ambos herbicidas presentaron buena linealidad en los intervalos de concentración estudiados, 0.25-5 mg L⁻¹ y 5-150 mg L⁻¹ para el diclofop-ácido y 5-150.0 mg L⁻¹ para el diclofop-metil, con coeficientes de determinación (R²) comprendidos entre 0.9920 y 0.9960. Los límites de detección y de cuantificación para cada herbicida fueron menores o iguales a 0.32 mg L⁻¹ y 1.07 mg L⁻¹ respectivamente. Como se puede observar, la variación en el día fue del orden del 2.5 %, y 1.5 % con respecto a la diferencia de tiempos de retención y tiempo de retención corregido del diclofop-metil respectivamente.

Tabla 54. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de los racematos del diclofop-ácido, diclofop-metil mediante el acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC-quiral.

Herbicida	Linealidad			LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)		Precisión mismo día (±RSD)		Precisión entre días (±RSD)	
	Concentración (mg L ⁻¹)*	R ²		1°	2°	1°	2°	ER	EF	ER	EF
		1°	2°								
diclofop-ácido	5-75	0.9960	0.9940	1.25	1.87	4.16	6.25	1.00 ± 0.05	0.50 ± 0.03	1.1 ± 0.1	0.50 ± 0.05
diclofop-metil	10-75	0.9940	0.9920	2.70	3.02	9.12	10.1	1.04 ± 0.02	0.50 ± 0.02	1.09 ± 0.09	0.50 ± 0.03

1° y 2° hacen referencia al primer y segundo enantiómero eluido respectivamente (n=6).

* referido a cada enantiómero

La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores estimados de RSD del 3.2 % y 3.1 % para la diferencia de tiempos de retención entre ambos herbicidas y el tiempo de retención corregido del diclofop-metil. De este modo se ha puesto de manifiesto la eficacia y buena precisión métodos de separación cromatográfica primaria mediante fase inversa para el diclofop-metil y su principal producto de hidrólisis diclofop-ácido, el cual permite obtener además buena sensibilidad en los intervalos estudiados.

Con respecto al acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral, tal y como se observa en los resultados mostrados en la tabla 54, se obtiene buena linealidad en los intervalos estudiados, 5-75.0 mg L⁻¹ para los enantiómeros del diclofop-ácido y 10-75.0 mg L⁻¹ para los del diclofop-metil. Los coeficientes de correlación (R²) obtenidos estuvieron comprendidos entre 0.9920 y 0.9960, mientras que los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero fueron menores o iguales a 3.2 mg L⁻¹ y 10.1 mg L⁻¹ respectivamente. Como se puede observar la variación en el día fue inferior al 5.0 %, y 3.0 % con respecto a la relación enantiomérica, y fracción enantiomérica respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue en torno al 10 % y 5.0 % para ER y EF respectivamente. Del mismo modo, los valores de ER y EF obtenidos son similares a los obtenidos teóricamente para mezclas racémicas según las ecuaciones 5 y 6 respectivamente.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que el método optimizado es bastante reproducible. Sin embargo, y como era de esperar, el acoplamiento bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral presenta menor sensibilidad que la separación quiral unidimensional conjunta de ambos herbicidas, ya que tan sólo una parte del pico es transferida a la segunda dimensión, sin olvidar el efecto adicional de dilución que conlleva este tipo de transferencias. Por otra parte los límites de detección que proporciona el método son aceptables a la hora de realizar determinaciones de dichos herbicidas en muestras complejas.

I.5.3. DETERMINACIÓN QUIRAL BIDIMENSIONAL DEL DICLOFOP-METIL Y DICLOFOP-ÁCIDO EN UN PREPARADO COMERCIAL

Una vez optimizado el acoplamiento bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral, se aplicó al análisis del diclofop-ácido y diclofop-metil en el mismo herbicida comercial (SIROFOP®) analizado mediante el método de separación quiral unidimensional

simultáneo de ambos herbicidas siguiendo el procedimiento experimental descrito en 2.2.3. de la parte experimental.

En primer lugar, con el fin de evaluar la complejidad de las muestras y la concentración aproximada del principio activo se analizaron varias muestras preparadas por dilución a partir del producto comercial SIROFOP®. A partir del producto concentrado se realizó una dilución con metanol 1/100, obteniendo una concentración aproximada de diclofop-metil de $3600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A partir de esta disolución intermedia, se prepararon disoluciones de SIROFOP® llevando 0.25 mL a 10 mL con la fase móvil correspondiente resultando un contenido aproximado de diclofop-metil (expresado como racemato) del orden de $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

El posible efecto matriz se estudió mediante la comparación de las pendientes de las rectas del calibrado externo y del calibrado por adiciones estándar. En primer lugar, se aplicó un test F para comparar las desviaciones estándar de dichas pendientes, revelando la inexistencia de diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 %. En segundo lugar se aplicó un test t para comparar dichas pendientes comprobándose que efectivamente no existía efecto matriz, ya que no existían diferencias significativas entre ellas a un nivel de confianza del 95 %, por lo que se decidió aplicar el calibrado externo para la cuantificación del diclofop-ácido y del diclofop-metil en las muestras de SIROFOP®. El análisis del herbicida SIROFOP® mediante la separación cromatográfica primaria reveló que efectivamente el componente activo mayoritario del producto era el diclofop-metil, aunque también se encontraron pequeñas cantidades de diclofop-ácido procedentes de la hidrólisis del éster metílico, así como picos correspondientes a compuestos no identificados propios de la materia endógena de la matriz. La composición cuantitativa del herbicida se estableció mediante el análisis de cuatro réplicas de muestras preparadas tal y como se ha especificado anteriormente y bajo las condiciones descritas en el apartado I.5.1 de dicha sección y el procedimiento 2.2.3 de la parte experimental. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 55.

Tabla 55. Resultados del análisis de la composición del herbicida SIROFOP®.

Herbicida	Composición (p/v), (%)
diclofop-ácido	5.9 ± 0.6
diclofop-metil	41 ± 7

En la figura 38 se muestra un cromatograma del análisis composicional del preparado comercial.

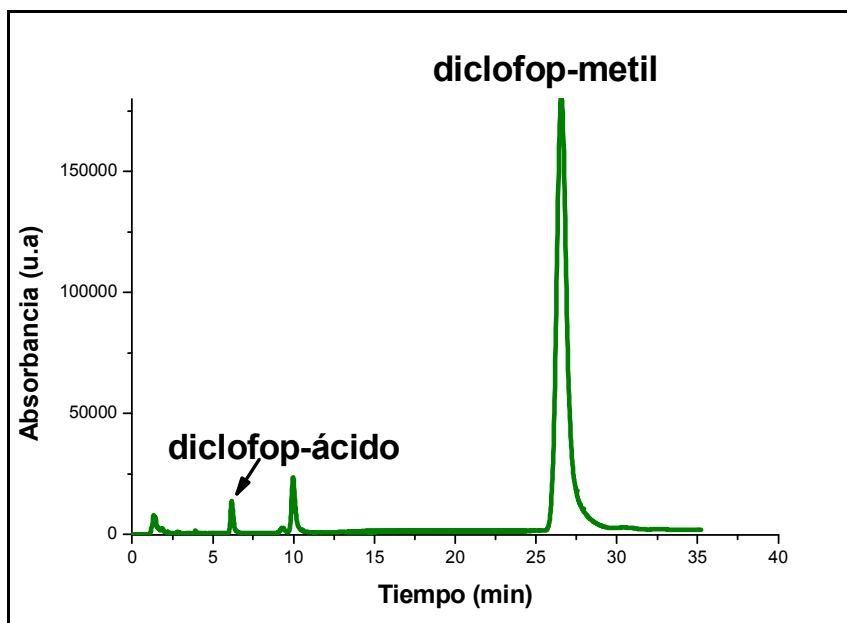


Figura 38. Cromatogramas de la separación quiral del preparado comercial SIROFOP®

Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente la concentración de diclofop-metil encontrada es similar a la especificada por el fabricante. Sin embargo casi un 6 % del diclofop-metil se encuentra en forma de su principal producto de hidrólisis, diclofop-ácido, el cual no aparece recogido en las especificaciones técnicas del producto.

Una vez conocida la composición cuantitativa de la formulación comercial se procedió al análisis quiral del diclofop-ácido y diclofop-metil en dicha muestra mediante el acoplamiento cromatográfico HPLC quiral-HPLC quiral desarrollado. Para ello se analizaron muestras de SIROFOP® preparadas según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.3. de la parte experimental. A partir de la disolución intermedia de preparado comercial, de concentración aproximada de diclofop-metil de $3600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, se prepararon disoluciones de SIROFOP® llevando 3 mL a 25 mL con la fase móvil correspondiente resultando un contenido aproximado de diclofop-metil (expresado como racemato) del orden de $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Se analizaron 6 réplicas mediante el acoplamiento bidimensional HPLC quiral- HPLC quiral optimizado, estableciendo los valores de relación y fracción enantiomérica para el diclofop-ácido y diclofop-metil en la muestra. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 56. El cromatograma obtenido en la separación bidimensional HPLC quiral-HPLC quiral de las muestras SIROFOP® se muestra en la figura 39.

Tabla 56. Resultados del análisis quiral bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral de muestras de SIROFOP®

Herbicida	ER \pm IC	EF \pm IC
diclofop-ácido	1.01 \pm 0.02	0.50 \pm 0.01
diclofop-metil	1.01 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01

*Intervalo para un nivel de confianza del 95 %.

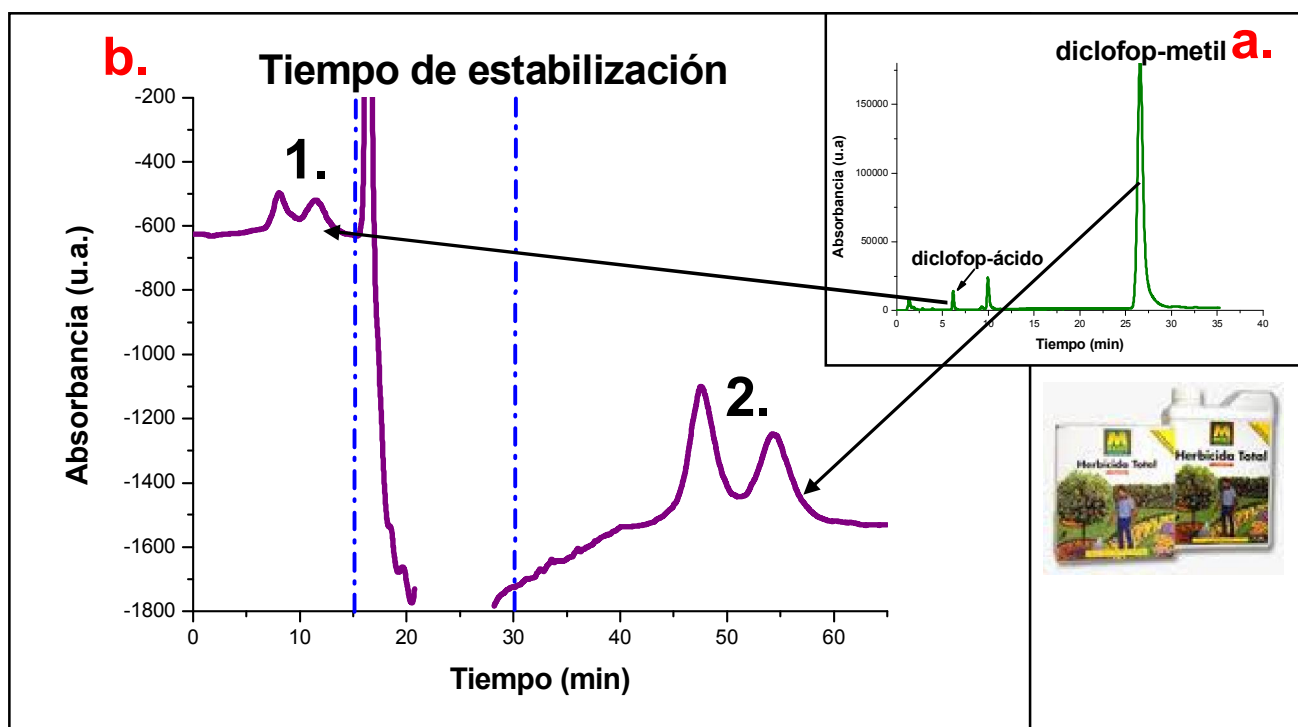


Figura 39. Cromatograma de una muestra de SIROFOP® analizada mediante el acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral:

- a) Separación primaria del diclofop-ácido y diclofop metil.
b) Separación enantiomérica del 1.) diclofop-ácido, 2.) diclofop-metil.

El análisis del preparado comercial mediante el acoplamiento cromatográfico optimizado, permitió comprobar que el diclofop-metil se comercializa efectivamente en forma de racemato, junto con pequeñas cantidades de diclofop-ácido en forma de impurezas provenientes del proceso de síntesis y en cantidades equivalentes de sus dos enantiómeros.

A la vista de los resultados anteriores, se comprobó que tanto los valores de relación como fracción enantiomérica obtenidos para ambos herbicidas son más próximos a la unidad y a 0.5 respectivamente que los obtenidos mediante el método de separación quiral unidimensional simultánea para ambos herbicidas especificados

en la tabla 44 del apartado 4.4 de dicha sección. Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos en el análisis quiral de las muestras por ambos métodos presentaban diferencias significativas, se aplicó el test t de Student de comparación de medias de dos series entre los resultados obtenidos para la relación y fracción enantiomérica de las 6 muestras de SIROFOP® de concentración aproximada de diclofop-metil $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ analizadas mediante el método de separación quiral unidimensional simultánea y los obtenidos en el análisis de 6 muestras de SIROFOP® mediante el acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral. En primer lugar se realizó un test F con el fin de comprobar si existía homogeneidad en las varianzas de ambas series de datos, planteando como hipótesis nula que las varianzas de los dos conjuntos eran iguales. En la mayoría de los casos dicho test reveló la existencia de diferencias significativas entre las varianzas de las serie de datos estudiados. Según los resultados obtenidos en el test de comparación de medias, en el caso del diclofop-metil no existían diferencias significativas entre las medias de los valores de relación y fracción enantiomérica obtenidos por ambos métodos y por tanto, ambas metodologías proporcionan valores de dichos parámetros con la misma exactitud. Sin embargo en el caso del diclofop-ácido, el test t reveló la existencia de diferencias significativas entre las medias de los valores de relación y fracción enantiomérica calculados por ambos métodos. Tal y como se pudo comprobar, el método de separación bidimensional mediante el acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral proporciona cromatogramas más limpios que el método unidimensional, permitiendo análisis quirales del diclofop-ácido más exactos.

Los resultados obtenidos muestran que el método de separación bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral es un método versátil que permite el análisis de herbicidas quirales en muestras tan complejas como un preparado comercial, proporcionando valores de descriptores quirales más próximos a los valores teóricos calculados según la ecuación 5 y 6, que el método de separación unidimensional, permitiendo comprobar que los herbicidas diclofop-ácido y diclofop-metil se comercializan en forma de racemato.

Este tipo de determinaciones no sería posible mediante el método de separación quiral unidimensional sin el uso de herramientas de deconvolución, ya que como ha quedado demostrado, los componentes propios de la matriz, pueden coeluir con el analito de interés dificultando así su análisis quiral. Aunque el acoplamiento bidimensional proporciona límites de detección mayores y por lo tanto menor sensibilidad, es mucho más indicado para análisis en los que la muestra es compleja,

ya que proporciona cromatogramas más limpios y sensibilidad suficiente evitando posibles etapas previas de limpieza de la muestra y preservando la integridad de la columna, garantizando así el buen funcionamiento de la misma durante un número más elevado de análisis. Además del efecto de limpieza en línea adicional que proporciona, el acoplamiento HPLC aquiral- HPLC quiral, es práctico y fácil de llevar a cabo y permite determinaciones precisas de descriptores quirales en muestras complejas.

PARTE II

DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y SUS PRECURSORES L-TRIPTÓFANO Y 5-OH-TRIPTÓFANO, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Tal y como se detalló en los antecedentes, el triptófano es uno de los aminoácidos esenciales más importantes dentro de la dieta y su ausencia puede conllevar graves problemas para la salud. Además, está relacionado con múltiples rutas metabólicas dentro del organismo, dentro de las cuales cabe destacar su papel como precursor del neurotransmisor serotonina, el cual modula los patrones de sueño y humor; por ello su deficiencia se ha relacionado con trastornos depresivos. Una dieta sana, equilibrada y rica en triptófano ayuda a mantener los niveles de serotonina en el cerebro, aunque muchos son los alimentos que al contener triptófano, pueden contener también serotonina y raramente el intermediario de dicha ruta metabólica, 5-OH-triptófano en concentraciones bajas del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ o menores.

Por tanto, la parte del trabajo realizado en esta tesis que se expone a continuación, trata de determinar serotonina y sus precursores, L-triptófano y 5-OH-triptófano en muestras de chocolate de diferente contenido en cacao mediante el uso de ***cromatografía capilar acoplada a espectrometría de masas***, optimizando las condiciones que proporcionasen la máxima sensibilidad en la detección mediante espectrometría de masas.

II.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LA SEROTONINA Y SUS PRECURSORES MEDIANTE cLC-MS

II.1.1. ENSAYOS PRELIMINARES

Algunos autores como Ly y col. (439) o Herraiz (61), sugieren que para de evitar la retención excesiva de la serotonina en columnas cromatográficas de fase inversa, se requiere el uso de fases móviles altamente acuosas y un pH ligeramente

ácido, pH en el cual, el grupo amino de la serotonina ($pK_a = 10.2$) se encuentra cargado. Así pues, los estudios previos de optimización comenzaron por la evaluación de varias fases móviles de composición acetonitrilo/formiato amónico 20 mM pH 4 y acetonitrilo/acetato amónico 20 mM pH 4 en una columna C_{18} capilar, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de la parte experimental, variando el porcentaje de modificador orgánico entre un 3-8 %, fijando un caudal de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ y un volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$, adquiriendo un cromatograma de iones totales (modo SCAN) con fines identificativos y escogiendo como iones monitorizados (modo SIM) m/z 221 para el 5-OH-triptófano, m/z 177 para la serotonina y m/z 205 para el triptófano.

Estos ensayos mostraron que efectivamente, se requerían fases móviles de elevado contenido acuoso (al menos un 3% de componente orgánico) para conseguir la retención de alguno de los analitos en la columna. Por otra parte, el cambio de formiato amónico por acetato amónico, suponía una ligera pérdida de sensibilidad (áreas de pico menores), por lo que se decidió continuar los estudios escogiendo formiato amónico como regulador de pH de la fase móvil. Seguidamente se evaluó la eficacia de separación de varias columnas cromatográficas capilares, fijando una fase móvil de composición acetonitrilo/tampón formiato amónico 20 mM pH 4 (3:97, v/v). Los resultados más significativos de dichos ensayos se resumen en la tabla 57.

Tabla 57. Resultados de los ensayos preliminares de la separación cromatográfica de la serotonina y sus precursores mediante cLC-MS

Exp.	Columna cromatográfica	tr 5-HTP (min)	tr 5-HT (min)	tr TP (min)
1	Luna $3\mu\text{m}$ C_{18} 150 x 0.30 mm	-	-	3.21
2	Synergi $4\mu\text{m}$ Fusion-RP 150 x 0.30 mm	-	2.45	4.14
3	Luna $3\mu\text{m}$ C_8 150 x 0.30 mm	-	-	3.76
4	Synergi $4\mu\text{m}$ MAX-RP 150 x 0.30 mm	3.58		5.529
5	ZORBAX SB $5\mu\text{m}$ 150 x 0.50 mm	1.803	3.471	6.751

Los resultados obtenidos muestran que:

1. En la mayoría de las columnas ensayadas, incluso con una fase móvil altamente acuosa, el 5-OH-triptófano y la serotonina no se retienen o coeluyen.
2. Únicamente la columna ZORBAX SB $5\mu\text{m}$ 150 x 0.50 mm conseguía la separación de los tres analitos a estudio en un tiempo de análisis razonable

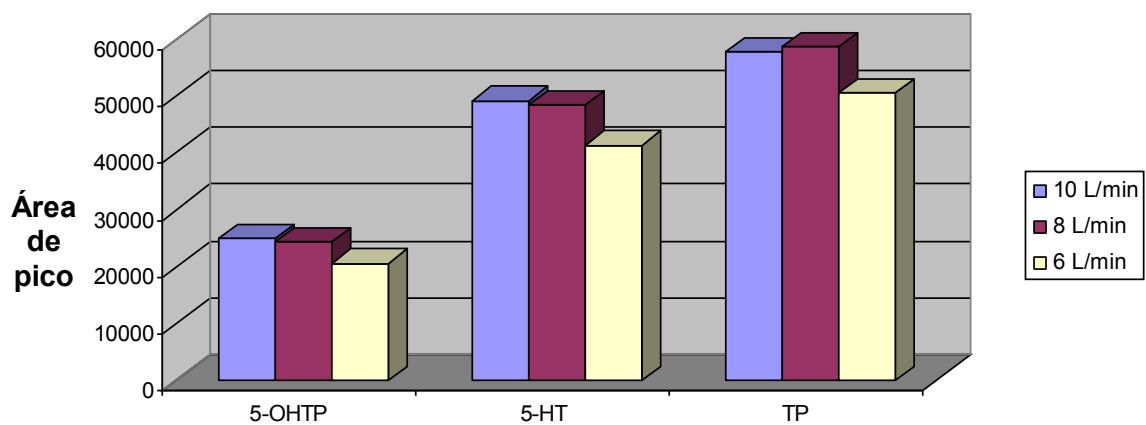
(menos de 10 min), por tanto se escogió dicha columna para continuar con los estudios de optimización.

Estos ensayos preliminares también demostraron que tanto el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil como la naturaleza del tampón del componente acuoso de la misma, influyen en gran medida en la retención de los analitos en la columna. Con el fin de evitar el ensanchamiento excesivo del pico cromatográfico correspondiente al triptófano, y por tanto la pérdida de sensibilidad en el análisis de dicho analito, se utilizaron diferentes gradientes de elución, en los cuales se aumentaba el porcentaje de acetonitrilo del 3 al 7 % en el momento en que la serotonina comenzaba a eluir. Finalmente se empleó el gradiente especificado en el apartado 3.1. de la parte experimental, fijando un caudal de $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ y un volumen de inyección de $20 \mu\text{L}$. Dicho gradiente comenzaba con una fase de composición inicial acetonitrilo/formiato amónico 20 mM pH 4 (3:97, v/v) manteniéndose durante 2 minutos, tiempo en el cual, el porcentaje de acetonitrilo se incrementó en un minuto al 7%. Esta composición se mantuvo durante 5 minutos, tiempo suficiente para eluir completamente el triptófano de la columna, volviendo a la composición inicial en 2 minutos, y manteniendo dicha composición hasta el minuto 12, asegurando así la estabilización de la columna para efectuar un nuevo análisis.

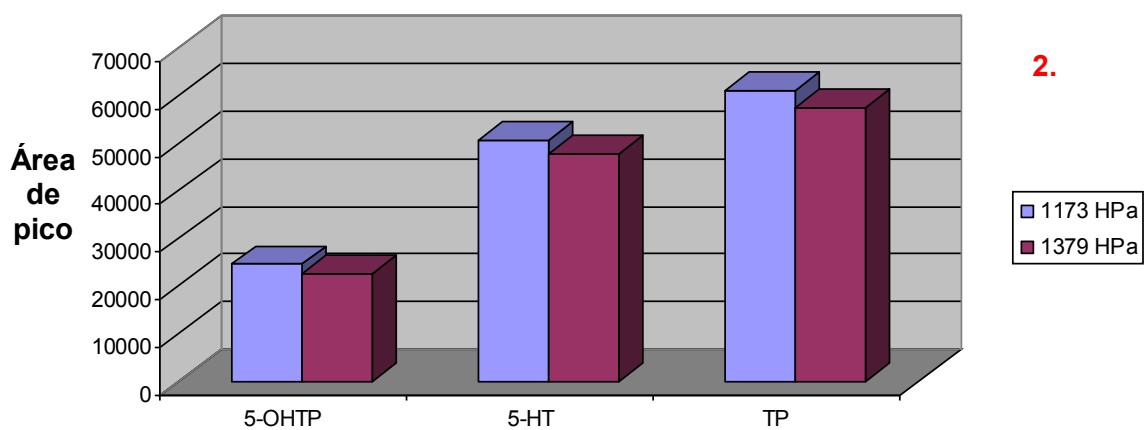
II.1.2. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Con el fin de alcanzar la máxima sensibilidad para los analitos estudiados, los parámetros característicos del espectrómetro de masas se optimizaron siguiendo el procedimiento propuesto por Huang y col. (272). Para ello, y mediante la inyección de disoluciones estándar que contenían $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cada uno de los analitos y utilizando las condiciones especificadas en el apartado 3.1. de la parte experimental, se estudió el efecto del caudal y la temperatura del gas secante, la presión del nebulizador y el voltaje del capilar en las áreas de pico de cada analito obtenidas en modo SIM. Los resultados obtenidos en dichos análisis se reflejan en la figura 40.

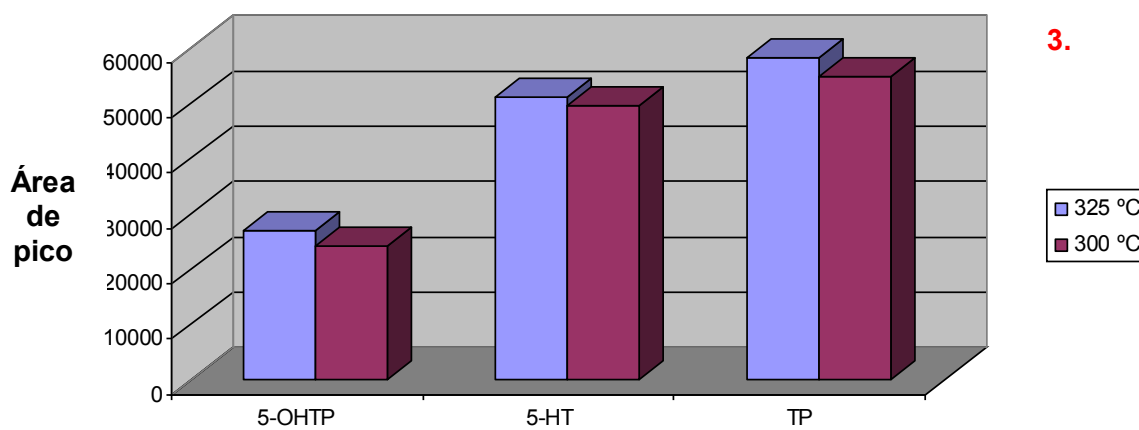
1.



2.



3.



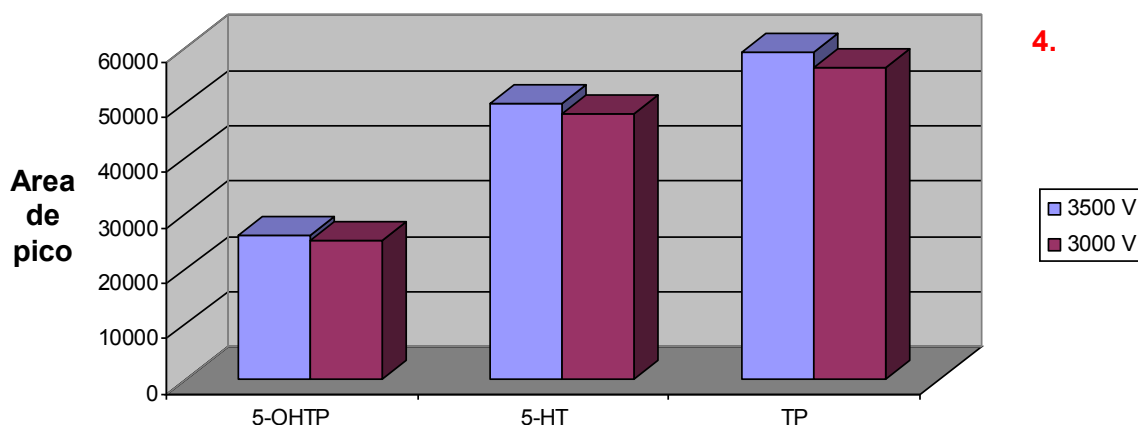


Figura 40. Representación del efecto de la variación de los parámetros del espectrómetro de masas

- (1) Caudal del gas secante (1173 HPa, 325 °C, 3500 V).
- (2) Presión del nebulizador (8 L/min, 325 °C, 3500 V).
- (3) Temperatura del gas secante (8 L/min, 1173 HPa, 3500 V).
- (4) Voltaje del capilar (8 L/min, 325 °C, 1173 HPa).

Tal y como se puede comprobar en la figura 40.1, a medida que aumenta el caudal de gas secante, aumenta el área de pico. Cabe destacar que los resultados obtenidos en el caso de un caudal de $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ó $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ son bastante similares, por lo que se decidió fijar $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ con el fin de no trabajar en condiciones de operación extremas para el equipo. En el caso de la presión del nebulizador, al variar de 1173 a 1379 HPa (fig 40.2) se observó una disminución en el área de pico de todos los analitos. En cuanto a la temperatura del gas secante y el voltaje del capilar (fig 40.3 y fig 40.4) se varió de 325 a 300 °C y de 3500 V a 3000 V respectivamente, observando en ambos casos una ligera disminución del área de pico de la serotonina y sus precursores. Atendiendo a estos resultados, se decidió fijar un caudal y una temperatura de gas secante de $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ y 325 °C respectivamente, la presión del nebulizador en 1173 HPa, y el voltaje del capilar en 3500 V.

II.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y DE FOCALIZACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Tal y como se comentó en los antecedentes, el pH de la fase móvil y la concentración del tampón del componente acuoso de la misma tienen un marcado efecto en la eficacia de ionización de los analitos y por tanto en el área de pico cuando

se trabaja en ESI- MS (229). Por otra parte, cuando se utiliza la cromatografía capilar al análisis de sustancias presentes en concentraciones muy bajas, como es el caso de la serotonina y sus precursores en alimentos, trabajar con grandes volúmenes de inyección en condiciones óptimas de focalización se convierte en un factor crítico. Por otra parte y a pesar de que en cromatografía en gradiente la anchura de los picos se mantiene constante, éste parámetro puede verse altamente afectado por otras variables como el poder de elución de la fase móvil, el volumen y la naturaleza de la disolución de inyección y sobretodo por la dispersión causada por la inyección de grandes volúmenes de muestra (225).

Así pues para identificar las variables que más afectaban al área y anchura de pico y por tanto a la sensibilidad obtenida en cLC-MS, se optó por un diseño experimental multifactorial personalizado con un total de 48 experimentos (36 experimentos y 12 réplicas de la zona central del dominio estudiado). Todos los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones estándar que contenían $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los analitos, fijando un caudal de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ y aplicando el gradiente especificado en el apartado 3.1 de la parte experimental, adquiriendo un cromatograma de iones totales (modo SCAN) con fines identificativos y escogiendo como iones monitorizados (modo SIM) m/z 221 para el 5-OH-triptófano, m/z 177 para la serotonina y m/z 205 para el triptófano.

Los factores estudiados fueron la concentración de tampón formiato, el pH del mismo, el volumen de inyección y la naturaleza de la disolución de inyección. Los intervalos de variabilidad de cada factor estudiados fueron:

- Concentración de tampón formiato: 5.0 -20 mM.
- pH del tampón: 4.0 y 6.0
- Volumen de inyección 5.0-20 μL
- Naturaleza de la disolución de inyección: en agua o en tampón.

El diseño experimental se normalizó dando valores -1, 0 y 1, y -0.33 en el caso del volumen de inyección de 10 μL , para comprobar la variable más influyente en las respuestas estudiadas (área y anchura de pico cromatográfico). La información más relevante del diseño experimental de los factores experimentales evaluados se recoge en la tabla 58.

Tabla 58. Resultados del diseño experimental de personalizado de la serotonina y sus precursores mediante cromatografía capilar-MS

Ex	Factores*				5-OH-triptófano		serotonina		L-tritófano	
	Concentración de tampón (mM)	Volúmen de inyección (μL)	pH	Condiciones de focalización	Área (u.a.)	Anchura (min)	Área (u.a.)	Anchura (min)	Área (u.a.)	Anchura (min)
1	5 (-1)	20 (1)	4 (-1)	Tampón (1)	36395	0.333	36862	0.404	85143	0.291
2	5 (-1)	20 (1)	4 (-1)	Agua (-1)	33131	0.329	27972	0.415	99097	0.306
3	12.5 (0)	20 (1)	4 (-1)	Tampón (1)	20675	0.299	51968	0.421	84483	0.309
4	12.5 (0)	20 (1)	4 (-1)	Tampón (1)	21543	0.298	53269	0.421	80190	0.292
5	12.5 (0)	20 (1)	4 (-1)	Agua (-1)	22448	0.326	41370	0.373	97862	0.301
6	12.5 (0)	20 (1)	4 (-1)	Agua (-1)	24395	0.323	40954	0.381	98845	0.299
7	20 (1)	20 (1)	4 (-1)	Tampón (1)	15545	0.314	45639	0.436	63594	0.303
8	20 (1)	20 (1)	4 (-1)	Agua (-1)	14769	0.316	38057	0.374	86346	0.308
9	5 (-1)	20 (1)	6 (1)	Tampón (1)	28849	0.336	24796	0.407	83563	0.307
10	5 (-1)	20 (1)	6 (1)	Agua (-1)	28295	0.320	19971	0.305	11180	0.308
11	12.5 (0)	20 (1)	6 (1)	Tampón (1)	15471	0.311	16030	0.385	57153	0.319
12	12.5 (0)	20 (1)	6 (1)	Tampón (1)	17527	0.305	17202	0.400	67833	0.314
13	12.5 (0)	20 (1)	6 (1)	Agua (-1)	14046	0.328	13580	0.321	73202	0.321
14	12.5 (0)	20 (1)	6 (1)	Agua (-1)	15002	0.319	12963	0.325	75654	0.324
15	20 (1)	20 (1)	6 (1)	Tampón (1)	11780	0.314	14200	0.384	43070	0.293
16	20 (1)	20 (1)	6 (1)	Agua (-1)	10600	0.339	11585	0.342	42213	0.305
17	5 (-1)	5 (-1)	4 (-1)	Tampón	10112	0.251	26651	0.372	22599	0.271
18	5 (-1)	5 (-1)	4 (-1)	Agua (-1)	9834	0.250	25190	0.356	24655	0.251
19	12.5 (0)	5 (-1)	4 (-1)	Tampón (1)	4627	0.245	6961	0.332	10847	0.242
20	12.5 (0)	5 (-1)	4 (-1)	Tampón (1)	4870	0.242	6913	0.336	10887	0.245
21	12.5 (0)	5 (-1)	4 (-1)	Agua (-1)	4599	0.251	6859	0.333	14704	0.260
22	12.5 (0)	5 (-1)	4 (-1)	Agua (-1)	4189	0.249	6246	0.347	12978	0.249
23	20 (1)	5 (-1)	4 (-1)	Tampón (1)	5243	0.237	10353	0.354	19831	0.257
24	20 (1)	5 (-1)	4 (-1)	Agua (-1)	3985	0.234	12586	0.377	21456	0.256
25	5 (-1)	5 (-1)	6 (1)	Tampón (1)	6170	0.212	5688	0.233	33359	0.287
26	5 (-1)	5 (-1)	6 (1)	Agua (-1)	7334	0.243	6553	0.194	34148	0.276
27	12.5 (0)	5 (-1)	6 (1)	Tampón (1)	7492	0.262	7492	0.300	35080	0.302
28	12.5 (0)	5 (-1)	6 (1)	Tampón (1)	6296	0.238	6958	0.312	37504	0.304
29	12.5 (0)	5 (-1)	6 (1)	Agua (-1)	4717	0.245	4924	0.305	39422	0.317
30	12.5 (0)	5 (-1)	6 (1)	Agua (-1)	4727	0.241	4852	0.297	37000	0.321
31	20 (1)	5 (-1)	6 (1)	Tampón (1)	7185	0.246	4494	0.294	38670	0.306
32	20 (1)	5 (-1)	6 (1)	Agua (-1)	4334	0.213	3480	0.311	31671	0.320
33	5 (-1)	10 (-0.33)	4 (-1)	Tampón (1)	25469	0.308	46081	0.358	72612	0.299
34	5 (-1)	10 (-0.33)	4 (-1)	Agua (-1)	25120	0.312	48418	0.391	72826	0.307
35	12.5 (0)	10 (-0.33)	4 (-1)	Tampón (1)	15641	0.291	30465	0.396	51981	0.301
36	12.5 (0)	10 (-0.33)	4 (-1)	Tampón (1)	12699	0.278	28615	0.359	49338	0.289
37	12.5 (0)	10 (-0.33)	4 (-1)	Agua (-1)	12066	0.283	24871	0.357	48107	0.302
38	12.5 (0)	10 (-0.33)	4 (-1)	Agua (-1)	11448	0.286	24611	0.374	46409	0.297
39	20 (1)	10 (-0.33)	4 (-1)	Tampón (1)	16071	0.286	29208	0.415	63150	0.311
40	20 (1)	10 (-0.33)	4 (-1)	Agua (-1)	14884	0.288	21791	0.376	63040	0.305
41	5 (-1)	10 (-0.33)	6 (1)	Tampón (1)	10879	0.281	10879	0.291	54062	0.313
42	5 (-1)	10 (-0.33)	6 (1)	Agua (-1)	13549	0.320	7041	0.297	45032	0.270
43	12.5 (0)	10 (-0.33)	6 (1)	Tampón (1)	5993	0.292	5929	0.357	31656	0.296
44	12.5 (0)	10 (-0.33)	6 (1)	Tampón (1)	5328	0.289	5752	0.372	33180	0.319
45	12.5 (0)	10 (-0.33)	6 (1)	Agua (-1)	5844	0.297	5029	0.300	32895	0.312
46	12.5 (0)	10 (-0.33)	6 (1)	Agua (-1)	5804	0.309	5552	0.308	32818	0.306
47	20 (1)	10 (-0.33)	6 (1)	Tampón (1)	5635	0.288	5625	0.351	30154	0.301
48	20 (1)	10 (-0.33)	6 (1)	Agua (-1)	5599	0.314	5136	0.347	28558	0.287

* Entre paréntesis se muestra el nivel de variación normalizado

Mediante los resultados obtenidos en los experimentos del diseño experimental planteado, se pudieron obtener las ecuaciones que definían las superficies de respuesta experimental. El análisis de los diseños se realizó mediante el programa estadístico **STATGRAPHICS PLUS Versión 5.0**. Así, la variación del área y la anchura de pico en función de los factores estudiados se ajustaron a una ecuación polinómica lineal con interacciones o efectos de cruce:

Ec. [13]

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_1x_2 + a_6x_1x_3 + a_7x_1x_4 + a_8x_2x_3 + a_9x_2x_4 + a_{10}x_3x_4$$

En la tabla 59, se muestran los valores de los coeficientes experimentales obtenidos (a_0 - a_{10}) en los ajustes realizados para la serotonina, L-triptófano y 5-OH-triptófano, así como los coeficientes de correlación múltiple (R^2) de los modelos, los valores de probabilidad (valores-P) y los errores de estimación estándar (SEE).

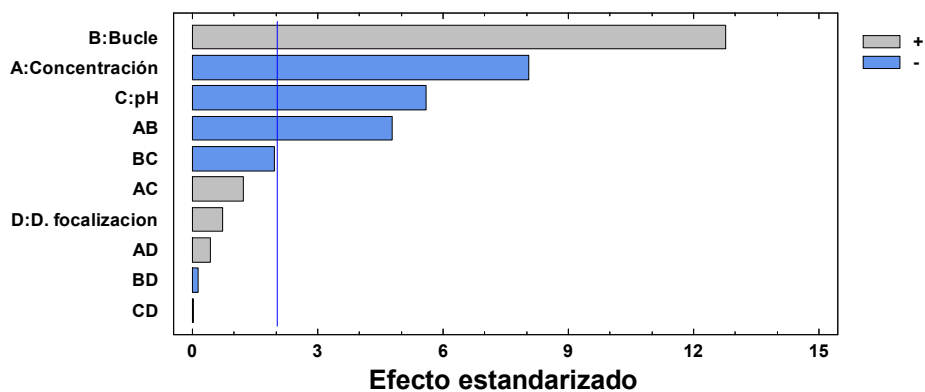
A la vista de los resultados mostrados en dicha tabla, se observa que los valores del coeficiente de correlación múltiple (R^2) obtenidos indican que los modelos matemáticos explican entre el 78 % y el 88 % de la variabilidad en las respuestas estudiadas. El error de estimación estándar (SEE) de los modelos se encuentra entre 3258-7476 y 0.017-0.023 para el área y la anchura de pico respectivamente, lo que indica la fiabilidad de las ecuaciones. Los valores-P mostrados en dicha tabla en cursiva y en negrita, calculados a un nivel de confianza del 95 % con un valor menor a 0.05, indican los factores experimentales que afectan de manera significativa a las respuestas estudiadas.

Los resultados de la tabla 59 y los gráficos de Pareto mostrados en la figura 41, muestran el peso de cada uno de los factores estudiados en cada respuesta. Comparando el peso de cada factor en el análisis de Pareto con el valor de los coeficientes de las ecuaciones de la tabla 65, se puede concluir, tanto para la serotonina como para el L-triptófano y el 5-OH-triptófano, que la concentración del tampón formiato y el pH del mismo afectan de forma negativa al área de pico, es decir cuando ambos factores se incrementan, el área de pico disminuye. Además, el pH también tiene un efecto importante en la anchura de pico de la serotonina y del L-triptófano. Mientras que en el caso de la serotonina, un aumento del pH produce una disminución en la anchura de pico, en el caso del triptófano y en menor medida en el 5-OH-triptófano se observa el efecto contrario.

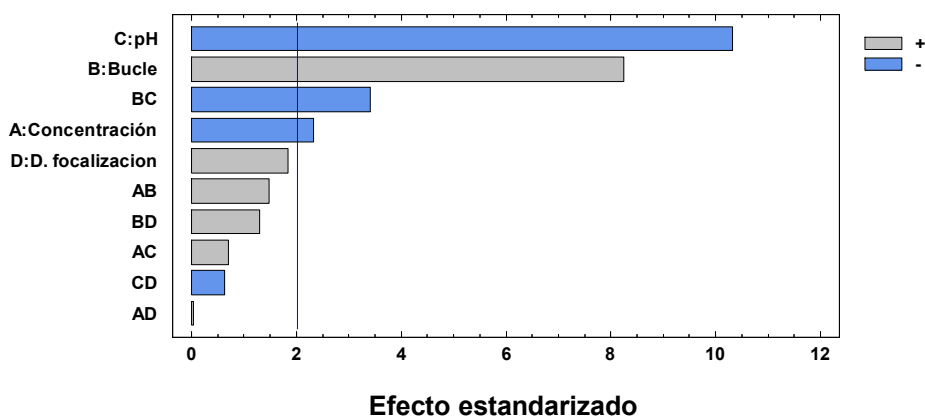
Table 59. Coeficientes de ajuste experimentales obtenidos en el modelo matemático según la ecuación 13, para la separación cromatográfica capilar de la serotonina y sus precursores

Analito	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}	R^2	SEE
5-OH-triptófano													
Área	16674	-5401 0.0001	7219 0.0001	-2649 0.0001	342 0.4764	-3835 0.0001	817 0.2268	278 0.6781	-1110 0.0574	-74 0.8965	15 0.9744	0.882	3258
Anchura	0.290	-0.004 0.2525	0.035 0.0001	0.001 0.8168	-0.003 0.1956	-0.001 0.9321	0.004 0.2409	0.001 0.7266	0.003 0.3703	-0.003 0.3496	-0.001 0.5979	0.781	0.019
serotonina													
Área	20181	-3329 0.0258	9665 0.0001	-10152 0.0001	1802 0.0748	2444 0.1488	964 0.4886	45 0.9743	-4001 0.0016	1529 0.2003	-618 0.5296	0.841	6750
Anchura	0.354	0.013 0.0107	0.031 0.0001	-0.026 0.0001	0.013 0.0004	-0.011 0.0521	0.011 0.0249	0.0001 0.9840	0.006 0.1611	0.013 0.0030	0.005 0.1062	0.825	0.023
L-triptófano													
Área	53789	-9589 0.0001	25908 0.0001	-4044 0.0154	-2388 0.1422	-8706 0.0025	-3671 0.1085	893 0.6918	-7048 0.0007	-3449 0.0775	977 0.5396	0.865	7476
Anchura	0.300	0.002 0.4968	0.012 0.0001	0.009 0.0006	-0.001 0.7162	-0.003 0.4382	0.001 0.6448	-0.002 0.4569	-0.008 0.0089	-0.001 0.7987	0.0005 0.8383	0.850	0.017

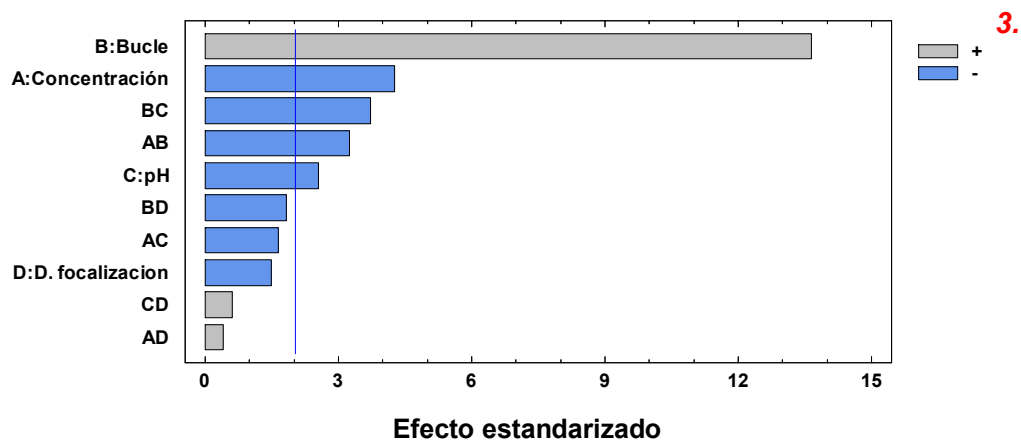
Área de pico de 5-OH-triptófano



Área de pico de serotonina



Área de pico de triptófano



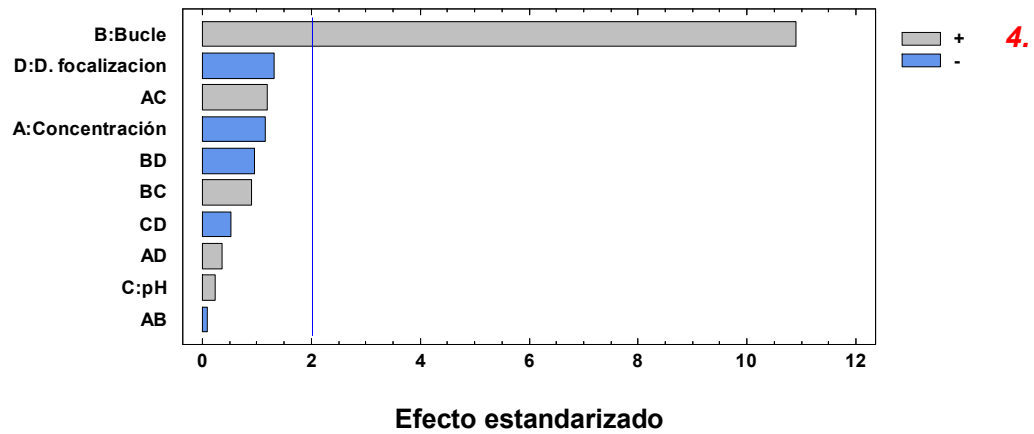
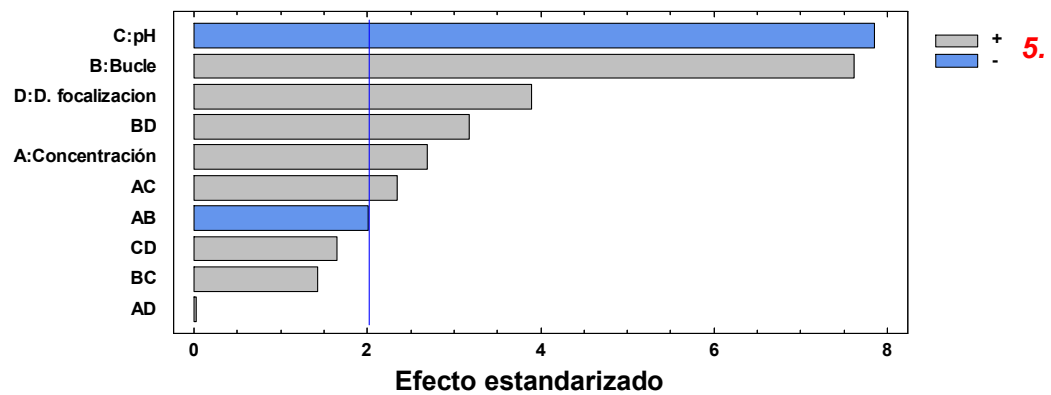
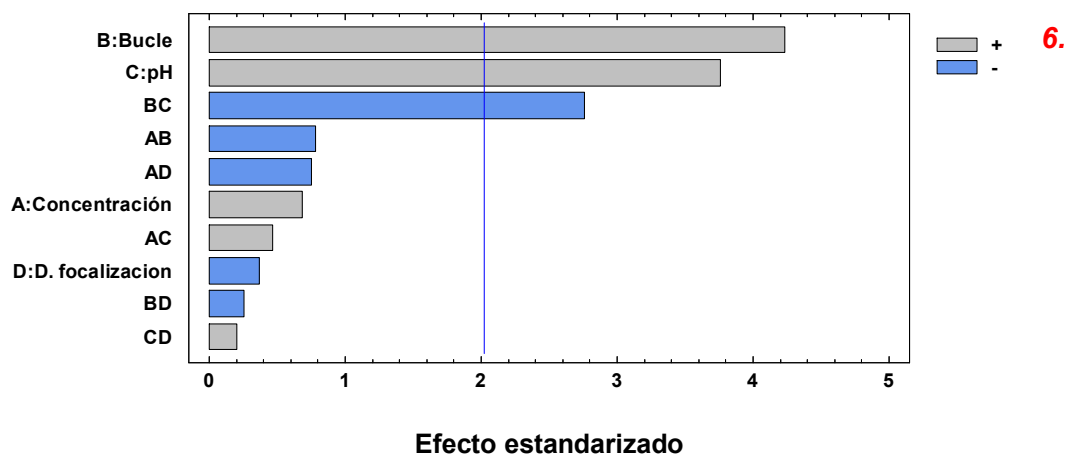
Anchura de pico de 5-OH-triptófano*Anchura de pico de serotonina**Anchura de pico de triptófano*

Figura 41. Gráficos de Pareto. Representación del peso de cada factor en el área y anchura de pico de cada analito estudiado

El efecto del pH está relacionado principalmente con el pKa de los analitos. El L-triptófano y el 5-OH-triptófano poseen dos valores de pKa, y sus puntos isoeléctricos son próximos a 6 (5.93 y 5.76 respectivamente), por lo que a pH 6 la carga neta de los analitos es próxima a 0 y las interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria son máximas y por tanto la anchura de pico se incrementa ligeramente, mientras que en el caso de la serotonina con pKa 10.2 este efecto no se observó (437). Aunque la naturaleza de la disolución de inyección es una variable cualitativa y no es posible considerar valores intermedios, ésta tiene un efecto notable en la anchura de pico de la serotonina, cuando la inyección se realiza en disolución tamponada se obtienen picos más anchos, mientras que en el caso del triptófano y 5-OH-triptófano se observó el efecto contrario, es decir la anchura de pico aumentaba cuando la disolución de inyección era agua. Este efecto puede estar relacionado con las propiedades ácido-base de estos dos analitos descritas anteriormente en los cuales el efecto del pH es más notable. La concentración del tampón únicamente mostró efecto en la anchura de pico de la serotonina, obteniendo los valores más altos a las concentraciones de tampón más altas.

Con respecto a los términos de interacción, el término concentración del tampón*volumen de inyección mostró un efecto negativo en el área del triptófano y del 5-OH-triptófano, mientras que la interacción entre el volumen de inyección *pH mostró efecto negativo también pero únicamente en el área de pico de la serotonina y del triptófano. Por otra parte, la interacción entre el volumen de inyección*pH y entre el volumen de inyección *disolución de focalización tuvo únicamente un efecto notable en la anchura de pico del L-triptófano y de la serotonina respectivamente.

Para visualizar los efectos más importantes en el área y anchura de pico de cada analito, se obtuvieron las superficies de respuestas estimadas a partir de las ecuaciones de la tabla 59, las cuales resultaron ser planos más o menos distorsionados debido a la importancia de los términos de interacción. A modo de ejemplo, en la figura 42 se muestran las superficies de respuesta estimadas para el área y la anchura de pico de la serotonina obtenidas fijando una concentración de tampón formiato de 5 mM y empleando agua como disolución de focalización. Las superficies de respuestas estimada de la figura 42 muestran que en general, al aumentar el volumen de inyección y disminuir el pH, aumentan tanto el área de pico como la anchura. La ligera torsión que presenta la forma de dichas superficies, se debe a la existencia de interacciones entre el volumen de inyección y el pH del tampón formiato.

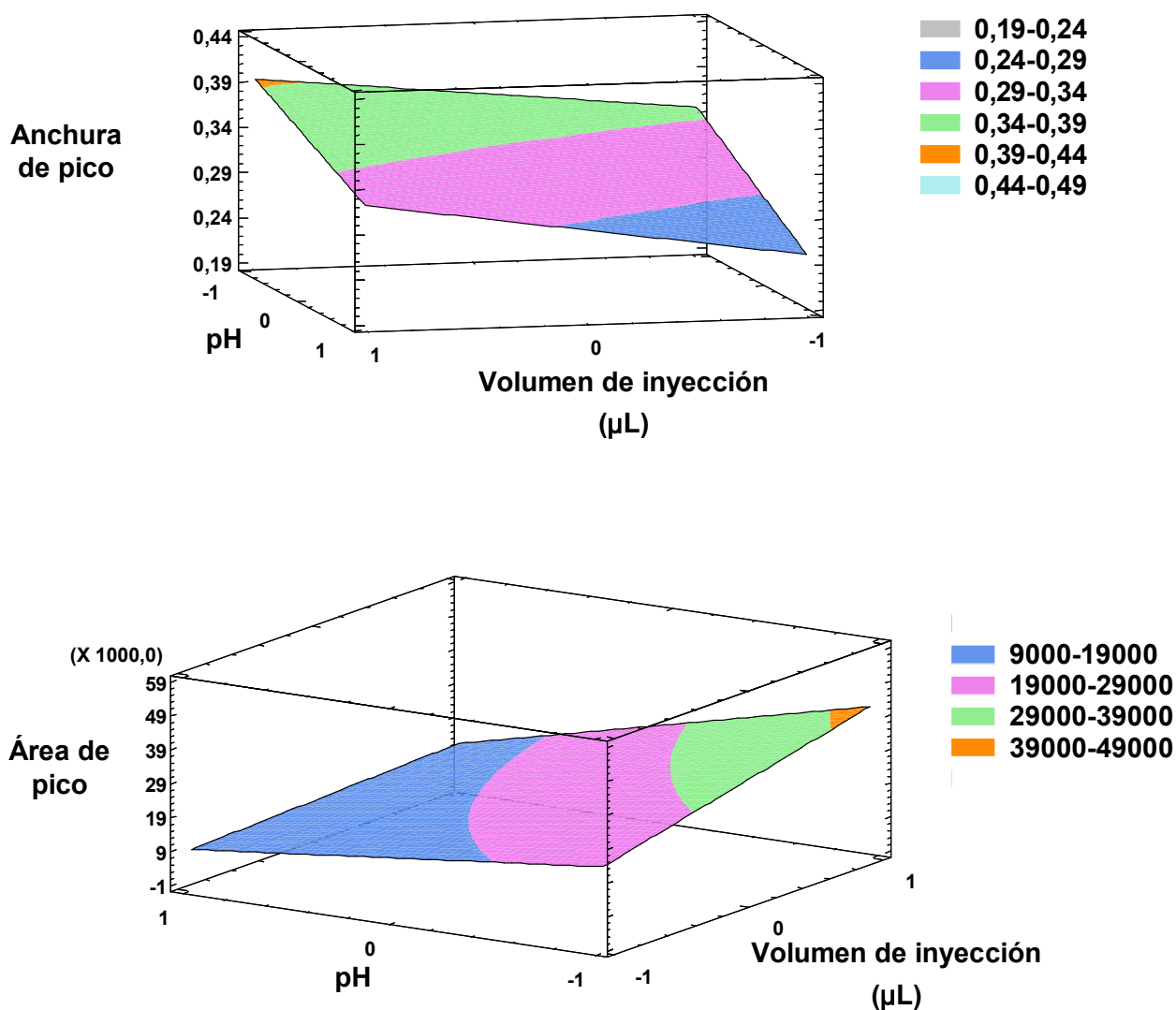


Figura 42. Mapas de superficie tridimensional estimada normalizada para el área y la anchura de pico de la serotonina.

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de separación y teniendo en cuenta las respuestas experimentales obtenidas, se utilizó el análisis multirespuesta como herramienta de optimización. El criterio seleccionado fue que la fase móvil debía proporcionar máxima sensibilidad en la detección mediante espectrometría de masas es decir, un área de pico máxima y una anchura mínima. Llegando a un compromiso entre los cuatro factores evaluados, se escogió la fase móvil que se muestra en la

tabla 60 y las condiciones de análisis especificadas en el apartado 3.1. de la parte experimental.

Tabla 60. Condiciones óptimas para la separación y determinación de la serotonina, L-triptófano y 5-OH-triptófano mediante cLC-MS

Condiciones	Analito		
	5-OH-triptófano	serotonina	L-triptófano
Columna cromatográfica	ZORBAX SB 5µm 150 x 0.50 mm		
Fase móvil	acetonitrilo-tampón formiato 5 mM pH 4.0 (3:97 v/v)		
Elución	Gradiente (tabla 19)		
Bucle de inyección (µL)	10		
Disolución de inyección	Agua		
m/z	221	177	205
Temperatura (°C)	25		

Bajo estas condiciones, los modelos matemáticos (tabla 65) predijeron unas áreas de pico de 21653, 31497 y 64881 para el 5-OH-triptófano, serotonina y L-triptófano respectivamente, y unas anchuras de pico de 0.28 (L-triptófano), 0.29 (5-OH-triptófano) y 0.36 (serotonina). Los valores predichos fueron comprobados experimentalmente mediante el análisis de disoluciones estándar que contenían 50 µg·L⁻¹ de cada uno de los analitos efectuando tres réplicas en un día (n=3) durante 3 días consecutivos (N=9), obteniendo RSDs comprendidos entre 1.7-7 % para las áreas de pico y entre 0.20-2.4 % para la anchura. Además, el análisis de la varianza de un factor reveló la no existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos experimentalmente y aquellos predichos por la ecuación [13] a un nivel de confianza del 95 %.

Con respecto al análisis de los espectros de masas, los resultados obtenidos fueron similares a los recogidos por Peterson y col (288) y Numan y Danielson (441). Básicamente se observaron dos tipos de iones: los iones moleculares [M+1]⁺ y fragmentos intensos [M+1-17]⁺ correspondiente a la pérdida bien de un grupo -OH o bien de un grupo -NH₃ en la serotonina (m/z 160) y en el 5-OH-triptófano (m/z 204). El espectro del L-triptófano, el cual no contiene grupos hidroxilo también mostró este tipo de fragmentos (m/z 188) posiblemente debido a la pérdida de un grupo -NH₃. El

cromatograma y el espectro de masas obtenido bajo las condiciones óptimas de separación se muestran en la figura 43.

III.1.3.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Las características analíticas del método de separación de la serotonina, y sus precursores, 5-OH-triptófano y L-triptófano mediante cLC-MS, se establecieron en las condiciones óptimas de análisis especificadas en la tabla 60 y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1. de la parte experimental. Los resultados se muestran en la tabla 61.

Al igual que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, los LOD y LOQ de cada analito se han determinado mediante el análisis de disoluciones cada vez más diluidas hasta que la señal se confunde con el ruido, calculando el límite de detección como la concentración que corresponde con 3 veces la altura de la señal del ruido en las proximidades del pico cromatográfico y en el caso del límite de cuantificación con 10 veces la altura del ruido (442). Los límites de detección y de cuantificación calculados en modo SIM para cada analito fueron menores o iguales a $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1.65 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Los intervalos lineales se han establecido analizando disoluciones patrón de cada analito con concentraciones comprendidas en el intervalo $3\text{-}500 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso del 5-OH-triptofano y la serotonina ($n=9$) y $0.25\text{-}500 \mu\text{g L}^{-1}$ para el L-triptófano ($n=12$). Los resultados se han analizado mediante regresión lineal utilizando las áreas de pico de cada uno de los analitos. Todos ellos mostraron buena linealidad dentro de los intervalos de concentración estudiados con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0.9982 y 0.9995. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) del área y anchura de pico y del tiempo de retención de cada analito en el mismo día (intra-day) y entre días distintos (inter-day), inyectando disoluciones patrón con una concentración de 5, 50 y $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se han realizado 5 réplicas en el mismo día ($n= 5$) durante tres días consecutivos ($N= 15$). Como se puede observar, la variación en el día fue inferior al 4.7 %, 2.1 % y 0.6 % con respecto al área y anchura de pico y tiempo de retención respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores menores o iguales al 5.3 %, 2.8 % y 0.8 % para el área y anchura de pico y tiempo de retención respectivamente. Los resultados obtenidos para las disoluciones de concentración 5.0 y $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ fueron bastante similares a los anteriormente expuestos.

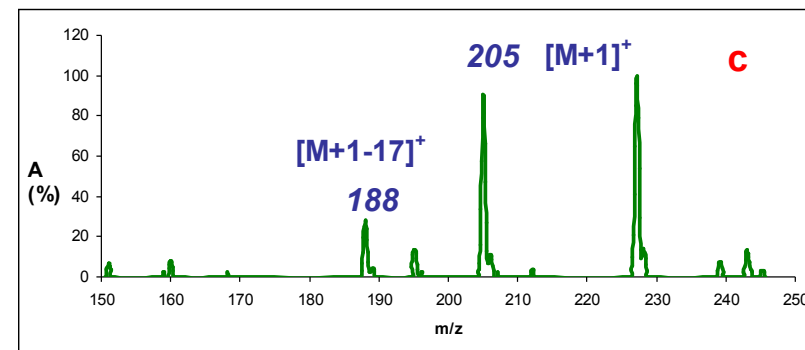
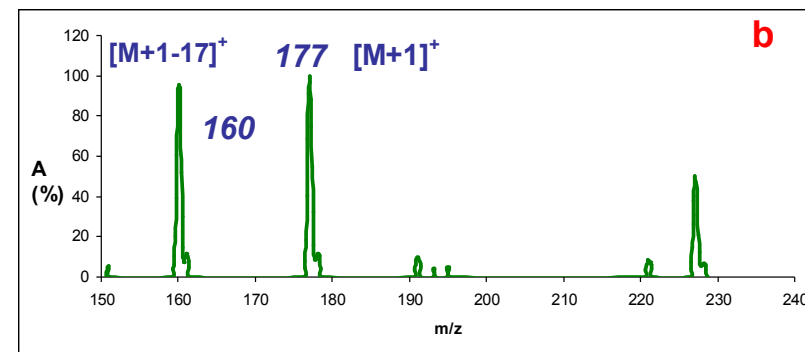
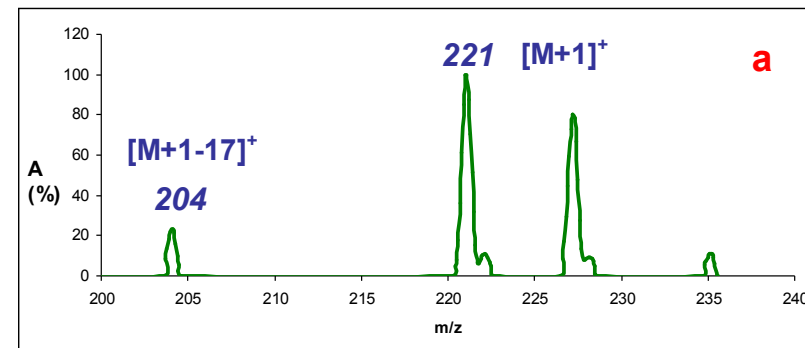
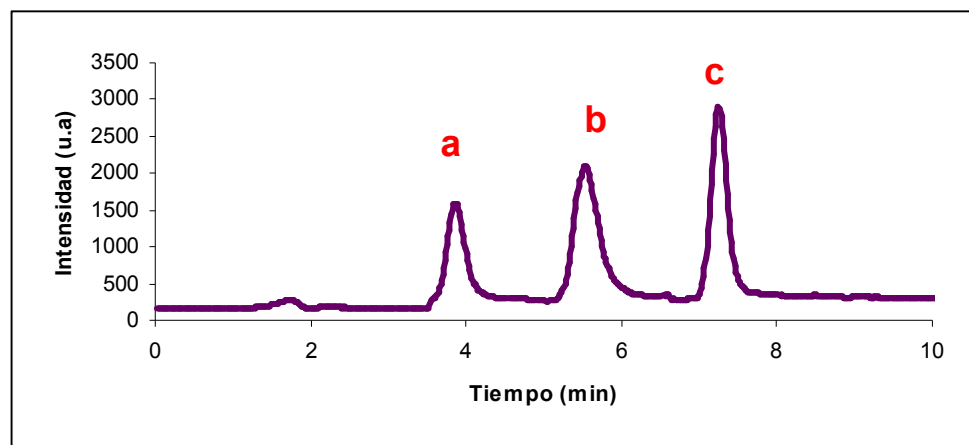


Figura 43. Cromatograma de la separación de la serotonina y sus precursores (modo SIM) mediante cLC-MS y espectros de masas obtenidos, bajo las condiciones especificadas en la tabla 66. (a) 5-hidroxitriptófano, (b) serotonina (c) L-triptófano.

Tabla 61. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de serotonina, 5-OH-triptófano, y L-triptófano.

Analito	Linealidad		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisión en el mismo día (RSD, %)* n=5			Precisión entre días (RSD, %)* N=15		
	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2			Área de pico	Anchura de pico	tr (min)	Área de pico	Anchura de pico	tr (min)
5-OH- triptófano	3-500	0.9995	0.44	1.46	4.7	1.7	0.3	5.3	1.1	0.4
serotonina		0.9991	0.50	1.65	2.4	1.8	0.6	3.3	2.8	0.8
L-triptófano	0.25-500	0.9982	0.04	0.13	2.3	2.1	0.1	4.5	1.9	0.4

* Disoluciones patrón de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

II.2. DETERMINACIÓN DE SEROTONINA, 5-OH-TRIPTÓFANO, Y L-TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE CHOCOLATE

La utilidad del método de separación de la serotonina y sus precursores mediante el método cLC-MS optimizado, se evaluó mediante el análisis de dichos analitos en muestras de chocolate comerciales de distinto contenido en cacao (70-99%) y cacao puro comercial y cacao ecológico. El chocolate, considerado como uno de llamados "alimentos de la felicidad o del bienestar", además de contener pequeñas cantidades de serotonina, induce la síntesis de esta en el cerebro, elevando o mejorando de forma natural el estado de ánimo, de ahí que se escogiese esta muestra como objeto de estudio.

II.2.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Tal y como se señaló en los antecedentes, la extracción de aminoácidos comúnmente se lleva a cabo mediante hidrólisis ácidas o básicas a altas temperaturas. Dichos tratamientos pueden resultar bastante agresivos en concreto para aminoácidos lábiles como el L-triptófano, por tanto para evitar posibles transformaciones, la preparación de la muestra se ha realizado mediante extracción sólido-líquido asistida por baño de ultrasonidos a temperatura ambiente.

- **Estudio de la eficacia de la extracción.**

El método de extracción para serotonina y aminas biogénicas propuesto por Pastore y col (276), basado en la extracción de dichos analitos mediante ultrasonidos previa eliminación de las grasas, se modificó ligeramente para adecuarlo al análisis mediante cLC-MS.

Los estudios se comenzaron realizando dos etapas de limpieza mediante extracción con disolventes orgánicos mediante agitación mecánica, con el fin de eliminar las grasas presentes en el chocolate. Para ello, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1. de la parte experimental, se ensayaron dos disolventes orgánicos, hexano y éter de petróleo. Se realizaron dos extracciones consecutivas con volúmenes de disolvente de 5.0 mL cada una y un tiempo de agitación mecánica de 10.0 min en cada una de ellas. En cada etapa, el extracto orgánico se separó del chocolate mediante centrifugación durante 10 minutos a 4200 rpm. Bajo las mismas

condiciones, el éter de petróleo proporcionaba extractos más claros y parecía extraer una mayor cantidad de grasa, por lo que se escogió dicho disolvente para continuar con los estudios de extracción.

Con el fin de comprobar que en las etapas de limpieza no se producían pérdidas de ninguno de los analitos, los extractos orgánicos se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en 1 mL de agua, con fines de focalización para su análisis cromatográfico. En el análisis de dichos extractos bajo las condiciones especificadas en el procedimiento 3.1. de la parte experimental, no se observó ningún pico cromatográfico correspondiente a la serotonina y sus precursores, por lo que en esta etapa previa de limpieza no se producían pérdidas apreciables de ningún analito.

Como paso previo a la optimización de la extracción de la serotonina y sus precursores, se llevaron a cabo una serie de pruebas con muestras de chocolate sin enriquecer, sometiéndolas a extracción sólido-líquido asistida por diferentes procedimientos: agitación en baño de ultrasonidos, agitación en vortex y agitación mecánica, en las mismas condiciones (5 minutos de tratamiento y 2 mL de MeOH), para controlar la posibilidad de extracción de materia endógena y posibles interferentes que pudiesen dificultar la eficacia de ionización de los analitos. Una alícuota del extracto final de 50 μL se llevó a un volumen final de 1 mL de agua milli-Q con fines de focalización y las muestras se analizaron bajo las condiciones previamente optimizadas descritas en el apartado 3.1. de la parte experimental. Finalmente y gracias al acoplamiento en serie de un detector de hilera de diodos al espectrómetro de masas, se pudo monitorizar la cantidad de materia endógena extraída en cada método comprobando que la extracción agitación en baño de ultrasonidos al ser un tratamiento suave, aseguraba la integridad del L-triptófano extrayendo a la vez menos materia endógena interferente que el resto de tratamientos.

Las condiciones óptimas para la extracción de los analitos en las muestras se han establecido en función de parámetros como la naturaleza del medio extractante, tiempo de extracción y naturaleza del filtro empleado, previa inyección cromatográfica. Todos los experimentos se han realizado por triplicado con un gramo de muestra y una cantidad adicionada de $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito evaluando la recuperación obtenida en cada caso mediante comparación de las áreas obtenidas en un extracto de chocolate enriquecido con la misma concentración.

Siguiendo el método propuesto por Pastore y col. (276), los estudios se comenzaron realizando una etapa de extracción con un volumen de disolvente de 5.0 mL y un tiempo de agitación en baño de ultrasonidos de 20.0 min. Como agentes extractantes se probaron ácido fórmico 0.2 M como medio extractante ligeramente fuerte, ácido acético 0.2 M, como medio ligeramente ácido y ácido ascórbico 1 mM, como ácido antioxidante (75). Después de la extracción, los extractos se separaron del residuo sólido mediante centrifugación a 4200 rpm durante 45 minutos. Una alícuota del extracto final de 50 μ L se llevó a un volumen final de 1 mL de agua milli-Q con fines de focalización. Las muestras se analizaron cromatográficamente bajo las condiciones detalladas en el apartado 3.1. de dicha sección. Las recuperaciones obtenidas en cada caso se muestran en la figura 43.

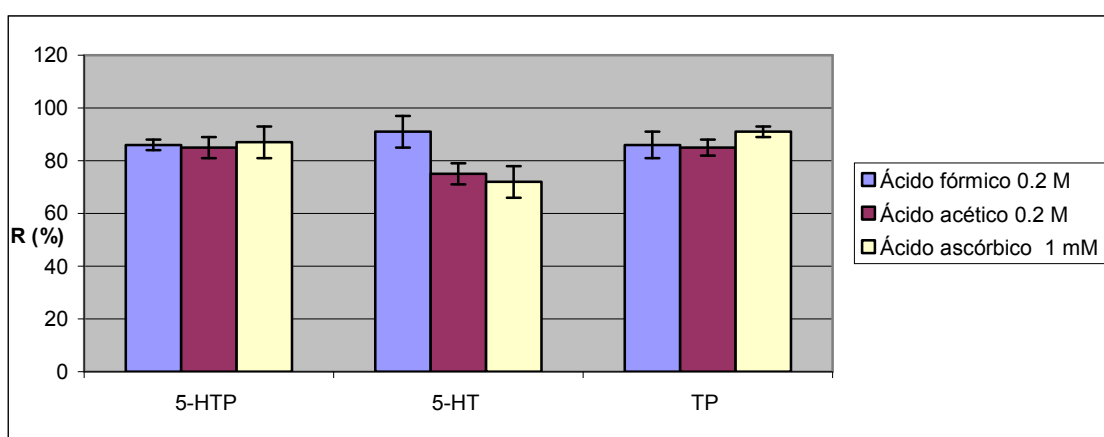


Figura 43. Influencia del agente extractante en la eficacia de extracción de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate.

Como puede observarse en la figura, en el caso de la serotonina, el uso de ácido fórmico 0.2 M proporcionaba los mejores rendimientos de extracción. Los resultados obtenidos parecen estar de acuerdo con los recogidos por Önal (443) quien sugiere que la desorción y extracción de aminas biogénicas en alimentos requiere de un medio ácido fuerte. La extracción del 5-OH-triptófano, parece ser independiente del medio de extracción, puesto que los resultados obtenidos con los tres ácidos ensayados son bastante similares. Con respecto al L-triptófano, a pesar de que los rendimientos de extracción con disoluciones de ácido fórmico y ácido acético son ligeramente menores que los obtenidos con ácido ascórbico, y que la utilización de un medio antioxidante como el ácido ascórbico, tal y como se señaló en los antecedentes, parece contribuir a preservar la integridad del mismo, como situación de compromiso se decidió utilizar una disolución de ácido fórmico 0.2 M como medio extractante, más adecuado para la extracción de la serotonina.

Una vez optimizada la naturaleza del disolvente extractante, se ha evaluado la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de los analitos. Para ello, la etapa de extracción con ácido fórmico se ha realizado durante tiempos de 10, 20 y 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 44.

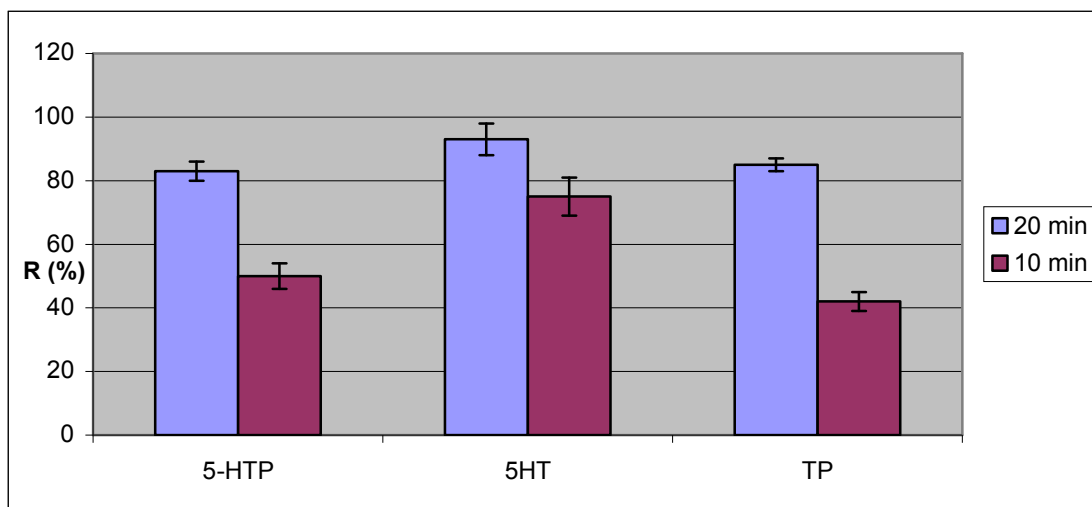


Figura 44. Influencia del tiempo en la eficacia de extracción con ultrasonidos.

Como se puede observar, la extracción de todos los analitos de las muestras de chocolate disminuyó considerablemente cuando el tiempo de extracción fue de 10 min. Por otro lado, los estudios mostraron que cuando el tiempo de tratamiento era de 30 minutos, la cantidad de materia endógena coextraída impedía el filtrado de las muestras y su posterior análisis, por lo que se seleccionó 20 minutos como óptimo para la extracción.

Finalmente se evaluó la naturaleza del filtro empleado en la eliminación de las partículas de mayor tamaño de las muestras. Así pues, se probaron filtros de 0.2 μm de tamaño de poro, de nailon y de PTEF. Cuando las muestras se inyectaban previo paso por el filtro de nailon, la recuperación de la serotonina disminuía considerablemente por lo que parecía quedarse retenida en el filtro, así pues finalmente se utilizaron los filtros de PTEF. Como se ha señalado anteriormente, en todos los casos una alícuota del extracto final de 50 μL se llevó a un volumen final de 1 mL de agua milli-Q con fines de focalización.

- **Estudio del efecto matriz.**

Una vez optimizado el método de extracción de la serotonina, 5-OH-triptófano y triptófano en muestras de chocolate, se estudió el posible efecto matriz que se observa en muchas ocasiones cuando se analizan muestras con matrices complejas en ESI-MS.

Algunos autores sugieren que si los compuestos orgánicos típicos de matrices reales, se encuentran en concentraciones superiores a 10^{-5} M, pueden competir con el analito en el proceso de formación de las pequeñas gotas cargadas del electrospray. Otra hipótesis sostiene que si la matriz contiene componentes no volátiles, estos impiden que las gotas de aerosol del analito lleguen a su radio crítico y por tanto no se formen los iones cargados en estado gaseoso. Así, como resultado de este posible efecto matriz la respuesta del analito en un disolvente puro pueden diferir sustancialmente de los obtenidos en una muestra (230).

Para evaluar el efecto matriz, muestras de chocolate de diferente contenido en cacao (70-100 %) se enriquecieron con cantidades crecientes y conocidas de cada uno de los analitos ($0.5 - 25 \mu\text{g g}^{-1}$). Las concentraciones iniciales de la serotonina y sus precursores se calcularon mediante el método de las adiciones estándar y mediante el calibrado externo (tabla 61). Los resultados obtenidos mostraron que en las muestras de chocolate analizadas no se detectó la presencia de 5-OH-triptófano y que las concentraciones de serotonina y L-triptófano obtenidos por ambos métodos eran ligeramente diferentes. El efecto matriz se estudió mediante la comparación de las pendientes de las rectas del calibrado externo y del calibrado por adiciones estándar. En primer lugar, se aplicó un test F para comparar las desviaciones estándar de dichas pendientes, revelando en la mayoría de los casos la existencia de diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 %. En segundo lugar se aplicó un test t para comparar dichas pendientes comprobándose que efectivamente existía un ligero efecto matriz a los niveles de concentración considerados en el estudio, ya que dicho test revelaba la existencia de diferencias significativas entre ambas pendientes un nivel de confianza del 95 %.

El efecto matriz se puede estimar mediante la versión modificada de la ecuación de Matuszewski (444):

$$\text{Ec. [14]} \quad \text{Efecto matriz, \%} = \left(\frac{A_{\text{chocolate}}}{A_{\text{estándar}}} - 1 \right) * 100$$

Dónde A chocolate es el área de pico de cada analito en las muestras de chocolate y A estándar es el área de pico de cada analito de cada compuesto en una disolución estándar de la misma concentración. Los resultados obtenidos en este estudio para un nivel de concentración de $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ se muestran en la tabla 62.

Tabla 62. Resultados del estudio del posible efecto matriz en la determinación de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate.

Contenido de cacao en el chocolate (%)	Efecto matriz 5-HTP (%)	Efecto matriz 5-HT (%)	Efecto matriz TP (%)
70	4	9	12
85	9	6	11
99	6	2	11
100	5	9	9
100 ecológico	6	9	15

Tal y como se observa en la tabla anterior, en ningún caso el efecto matriz superó el 15 %. Por tanto, para eliminar o compensar este leve efecto matriz se decidió utilizar el método de las adiciones estándar para la determinación de la serotonina y sus precursores en las muestras de chocolate.

▪ Características analíticas en muestras de chocolate

Una vez optimizado el método de extracción de la serotonina y sus precursores, se procedió al estudio de las características analíticas del método propuesto en las muestras de chocolate de distinto contenido en cacao. El análisis de los extractos mediante cLC-MS se ha realizado bajo las condiciones óptimas especificadas en el apartado 3.2.2. de la parte experimental. Para obtener los límites de detección, cuantificación y los calibrados en el intervalo adecuado de concentración, se han añadido cantidades crecientes de cada uno de los analitos sobre los extractos obtenidos tras el tratamiento de 1 gramo de chocolate. En el caso de la serotonina y el L-triptófano, los LODs y LOQs se estimaron analizando muestras que contenían una concentración aproximada, de ambos analitos, cercanas a 3 y 10 veces la relación señal ruido respectivamente aplicando el método de las adiciones estándar. Como el 5-OH-triptófano no se detectó en las muestras ensayadas, el LOD y LOQ se estimó añadiendo a la muestra dicho analito a una concentración

correspondiente con 3 veces la altura de la señal del ruido en las proximidades del pico cromatográfico y en el caso del límite de cuantificación con 10 veces la altura del ruido. La tabla 63 muestra las características analíticas obtenidas.

Tabla 63. Características analíticas del análisis de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate.

Contenido de cacao (%)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			Intervalo lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	5-HTP	5-HT	TP	5-HTP	5-HT	TP	5-HTP	5-HT	TP
100	0.10	0.09	0.01	0.33	0.32	0.06	0.5-25		
100 ecológico	0.12	0.10	0.02	0.41	0.34	0.07	0.5-25		
99	0.06	0.11	0.01	0.22	0.37	0.09	0.5-25		
85	0.08	0.12	0.01	0.26	0.40	0.04	0.5-25		
70	0.07	0.11	0.01	0.25	0.37	0.04	0.5-25		

En los resultados mostrados en dicha tabla, se puede observar que los límites de detección alcanzados para los extractos de los distintos chocolates varían entre 0.01 y 0.11 $\mu\text{g g}^{-1}$ y los de cuantificación entre 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0.41 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los analitos estudiados. La serotonina y sus precursores 5-OH-triptófano y L-triptófano han mostrado buena linealidad en el intervalo de concentraciones de 0.5-25 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($n=7$), obteniendo en todos los casos coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.9720.

▪ Estudio de recuperaciones en muestras de chocolate

Con el fin de evaluar la eficacia y la aplicabilidad de la metodología de extracción propuesta, se llevó a cabo un estudio de recuperaciones, añadiendo distintas cantidades de los analitos estudiados sobre muestras de un gramo de chocolate teniendo en cuenta las máximas cantidades de triptófano encontradas en semillas de cacao de distintas variedades (273). Por tanto, los niveles de adición escogidos se evaluaron en el intervalo de 2.5-9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para cada uno de los analitos. Las recuperaciones se calcularon por triplicado tras un periodo de estabilización de la muestra de 30 minutos en la oscuridad la estabilización en la oscuridad, una vez enriquecida con la serotonina y sus precursores.

En el caso de la serotonina y del L-triptófano, las recuperaciones se calcularon mediante el método de adiciones estándar teniendo en cuenta las cantidades iniciales de dichos analitos presentes en las muestras, mientras que para el 5-OH-triptófano se empleó el calibrado sobre matriz. En la tabla 64 se muestran los resultados obtenidos en dicho estudio de recuperaciones.

Tabla 64. Resultados de los estudios de recuperación de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate.

Contenido de cacao (%)	Añadido ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			Recuperación (%) (media \pm RSD)		
	5-HTP	5-HT	TP	5-HTP	5-HT	TP
100		2.5		76 \pm 1	84 \pm 5	86 \pm 3
		6.0		86 \pm 1	85 \pm 3	85 \pm 3
		9.0		94 \pm 3	97 \pm 2	95 \pm 2
100 ecológico		2.5		80 \pm 4	82 \pm 6	90 \pm 5
		6.0		89 \pm 7	95 \pm 1	94 \pm 2
		9.0		95 \pm 2	97 \pm 1	97 \pm 1
99		2.5		81 \pm 5	86 \pm 6	86 \pm 3
		6.0		86 \pm 3	93 \pm 4	97 \pm 2
		9.0		98 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2
85		2.5		85 \pm 4	91 \pm 2	89 \pm 8
		6.0		88 \pm 1	94 \pm 3	90 \pm 5
		9.0		96 \pm 3	97 \pm 2	97 \pm 4
70		2.5		81 \pm 7	89 \pm 7	86 \pm 3
		6.0		87 \pm 2	94 \pm 3	96 \pm 2
		9.0		96 \pm 3	95 \pm 2	93 \pm 2

Como se aprecia en la tabla 64, las recuperaciones obtenidas están comprendidas en el intervalo 76-97 %, observándose que las mayores recuperaciones se han obtenido al nivel más alto de adición. Las RSD obtenidas se encuentran entre 1-7 % para todos los niveles estudiados, demostrando la eficacia del procedimiento de extracción desarrollado para una matriz tan compleja como el chocolate, sin necesidad de un tratamiento de limpieza posterior.

II.2.1. DETERMINACIÓN DE LA SEROTONINA Y SUS PRECURSORES EN MUESTRAS DE CHOCOLATE DE DISTINTO CONTENIDO EN CACAO

Tal y como se expuso en los antecedentes, el chocolate contiene serotonina, en concentraciones que dependen del contenido en cacao. El chocolate negro con contenidos en cacao del más del 60 % puede contener serotonina en concentraciones entre $1.4\text{-}5\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, la información sobre los niveles de serotonina y sus precursores en el chocolate y de cómo varían durante la producción y el procesado de dicho alimento es escasa (445).

Por tanto, el método de separación de la serotonina y sus precursores mediante cLC-MS, así como la metodología de extracción propuesta, se aplicaron al análisis de los analitos objeto de estudio en muestras de chocolate comercial de distinto contenido en cacao (70-99 %) y de cacao puro y cacao ecológico, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2.. de la parte experimental. En la tabla 65 se muestran los resultados obtenidos.

Tal y como se muestra en dicha tabla el 5-HTP no se detectó en ninguna de las variedades de chocolate estudiadas. Los resultados parecen estar de acuerdo con aquellos recogidos por otros autores (269, 446-447) quienes sugieren que el 5-HTP no se encuentra en cantidades apreciables en los alimentos. Sin embargo tanto el L-triptófano como la serotonina se encontraron en cantidades significativas, independientemente del contenido de cacao del chocolate. Con el fin de detectar posibles diferencias entre las concentraciones encontradas de serotonina y L-triptófano entre un tipo de chocolate a otro se aplicó un test de análisis de la varianza (ANOVA). Los resultados de este test se muestran también en la tabla 65. Tal y como se observa en la tabla los valores de probabilidad obtenidos en el test F son menores a 0.05, lo que denota diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % entre las concentraciones medias de serotonina y L-triptófano entre una variedad de chocolate y otra. Mediante el test de rango múltiple se pudo comprobar entonces el porcentaje de cacao a partir del cual empezaban a aparecer tales diferencias significativas. Con respecto al L-triptófano, las diferencias significativas aparecían a partir de un contenido de cacao del 70 %.

Tabla 65. Concentración de serotonina y sus precursores en muestras de chocolate. Resultado del test ANOVA de la comparación de la cantidad de analito entre las distintas muestras.

Contenido en cacao (%)	5-OH-triptófano ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a (media \pm RSD)	Serotonina ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a (media \pm RSD)	L-triptófano ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a (media \pm RSD)	Relación de varianzas		*Valor de probabilidad	
				Serotonina	L-triptófano	Serotonina	L-triptófano
100%	n.d	1.30 \pm 0.06	4.06 \pm 0.04	260.78	901.18	0.0001	0.0001
100% (producto ecológico)	n.d	1.58 \pm 0.07	6.60 \pm 0.04				
99%	n.d	1.38 \pm 0.03	4.19 \pm 0.04				
85%	n.d	2.93 \pm 0.01	13.27 \pm 0.02				
70%	n.d	1.53 \pm 0.02	13.34 \pm 0.02				

n.d= no detectado.

^a n=3, referido a un gramo de chocolate.

* Como el valor-P del test F es menor de 0.05 existen diferencias significativas entre un contenido de cacao y otro a un nivel de confianza del 95 %.

El contenido más alto de este aminoácido ($13.27\text{-}13.34\ \mu\text{g g}^{-1}$) se encontró en aquellas muestras de chocolate con el menor contenido en cacao (70-85%). Estos resultados podrían estar de acuerdo con aquellos recogidos por Pascual y col. (448), quienes sugieren que la adición de leche al chocolate (disminución del contenido de cacao) incrementa el contenido proteico del alimento y por tanto la cantidad de aminoácidos libres, debido a la presencia de las proteínas de la leche.

Por otra parte, la síntesis de serotonina requiere unas cantidades adecuadas de vitamina B6 y magnesio, indispensables para que comience la ruta metabólica a partir del L-triptófano (449). El chocolate negro de alto contenido en cacao, generalmente contiene más cantidad de dichos nutrientes que aquellos de menor contenido en cacao o los chocolates con leche (448). Esta podría ser la razón por la que se observa una disminución de la concentración de L-triptófano de aquellos chocolates con menor contenido en cacao. Además, comparando las concentraciones de L-triptófano obtenidas en los chocolates comerciales con las típicas encontradas en semillas de cacao puro de distintas variedades (273), se observa que una disminución considerable en las variedades comerciales, lo que sugiere que el L-triptófano se ve altamente afectado durante la producción y el procesado del chocolate. Con respecto a la serotonina, las diferencias significativas entre variedades de chocolate, se empiezan a observar a partir del chocolate con un contenido de cacao del 85%, siendo esta variedad además la que presenta el mayor contenido ($2.93\ \mu\text{g g}^{-1}$).

Los resultados obtenidos son similares a los anteriormente recogidos por otros autores (60-61, 276), quienes detectaron la presencia de serotonina en muestras de chocolate en un intervalo de concentraciones de $0.1\text{-}2.9\ \mu\text{g g}^{-1}$. Las cantidades de serotonina encontradas en el chocolate sugieren que esta podría ser la razón de la sensación psicológica de deseo o adicción similar a los de otras sustancias adictivas, que provoca el consumo de este alimento. A modo de ejemplo en la figura 45, se presenta los cromatogramas de las muestras analizadas y el espectro de masas obtenido bajo las condiciones óptimas de separación de un chocolate comercial del 99% de contenido en cacao. Por tanto, el empleo de cLC-MS, combinada con un procedimiento de extracción suave por agitación en baño de ultrasonidos que impide la transformación química de las especies, han permitido la determinación de la serotonina y sus precursores L-triptófano y 5-OH-triptófano a los niveles de aplicación usuales de estos analitos en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Chocolate 99 % cacao

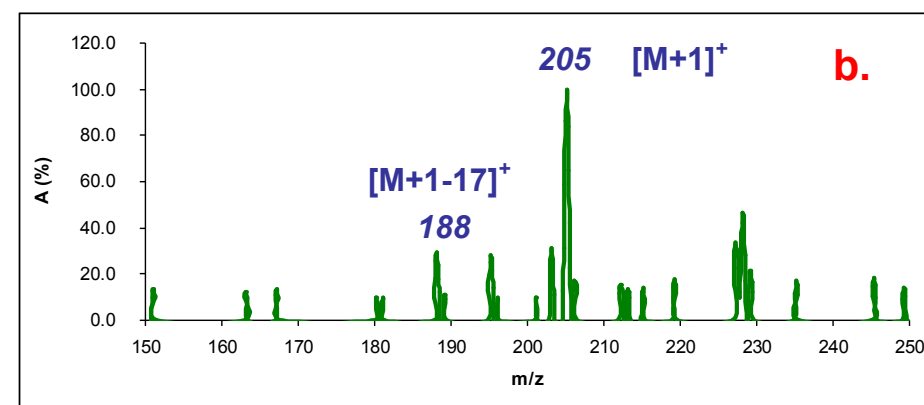
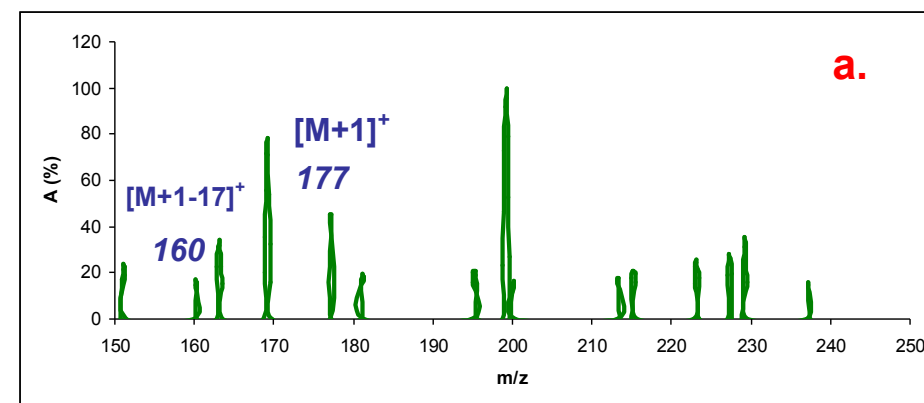
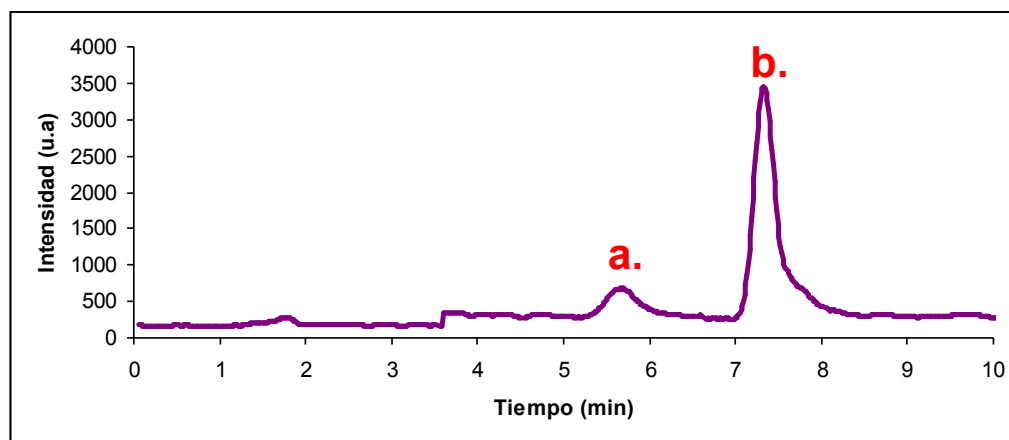


Figura 43. Cromatograma de la separación de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao (modo SIM) mediante cLC-MS y espectros de masas obtenidos, bajo las condiciones especificadas en la tabla 66. (a) serotonina (b) L-triptófano.

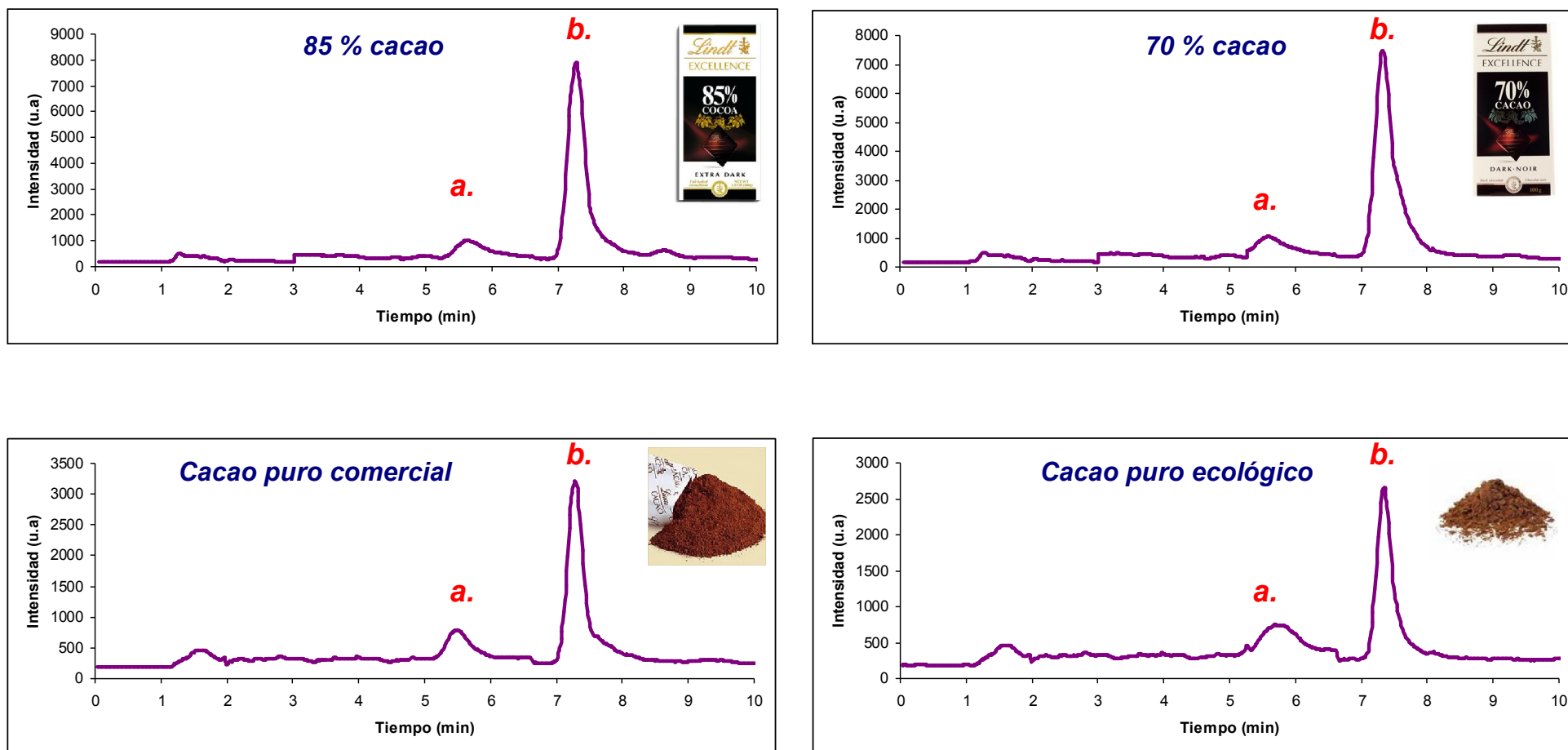


Figura 45. Cromatograma de la separación de la serotonina y sus precursores en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao (modo SIM) mediante cLC-MS y espectros de masas obtenidos, bajo las condiciones especificadas en la tabla 66. (a) serotonina (b) L-triptófano.

PARTE III

DETERMINACIÓN DE D-AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS TRATADOS CON RADIACIONES IONIZANTES. ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN SU COMPOSICIÓN

Como se ha puesto de manifiesto en la revisión bibliográfica, la determinación de los enantiómeros de los aminoácidos en alimentos resulta una problemática de especial interés, ya que la presencia de D-aminoácidos puede llevar a una dieta más pobre en nutrientes y a productos menos seguros desde un punto de vista toxicológico. Por tanto, la detección de D-aminoácidos en alimentos puede ser utilizada como indicador de la calidad de los mismos, para valorar el grado de fermentación, detección de adulteraciones, contaminaciones microbiológicas, o regular el uso y comercialización de algunos tipos de alimentos. Por otra parte, tal y como se ha reseñado en los antecedentes, el tratamiento de alimentos con radiaciones ionizantes con fines de higienización puede provocar cambios tanto en la composición aminoacídica como en la composición química de los mismos.

Por tanto, la parte del trabajo realizado en esta tesis que se expondrá a continuación, trata de detectar las posibles transformaciones de aminoácidos aromáticos susceptibles a la radiación (tirosina, fenilalanina y triptófano) en alimentos listos para el consumo (RTE) que habían sido sometidos a un tratamiento con radiaciones ionizantes a dosis de radiación comprendidas entre 1-8 kGy. Mediante el uso de **acoplamiento cromatográfico de tipo HPLC aquiral-HPLC quiral**, se detectaron las posibles racemizaciones así como los productos radiolíticos derivados de los aminoácidos estudiados considerados como marcadores de tratamientos con radiaciones ionizantes.

Teniendo que cuenta que el efecto de la radiación ionizante es función de la composición de cada alimento, se evaluaron las posibles modificaciones de distintos parámetros composicionales (proteínas, humedad, grasa, aditivos y aminoácidos libres) en los alimentos escogidos en el estudio (jamón cocido, carne picada, jamón ibérico, salmón ahumado y queso tipo sándwich) al ser irradiados. Los datos obtenidos se evaluaron mediante herramientas estadísticas tales como el análisis de la varianza

(ANOVA), test de rango múltiple (MRT), y quimiométricas como el análisis de componentes principales (PCA), o la regresión lineal múltiple (MLR).

III.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO

III.1.1. ENSAYOS PREVIOS

La determinación enantiomérica de aminoácidos mediante cromatografía quiral directa se puede llevar a cabo utilizando fases estacionarias quirales de distinta naturaleza. Tal y como quedó reflejado en los antecedentes, las fases estacionarias basadas en antibióticos macrocíclicos, más concretamente en teicoplanina, han proporcionado resultados muy satisfactorios. Por tanto, para la optimización de la separación cromatográfica quiral directa de la tirosina, fenilalanina y triptófano se escogió una columna quiral Chirobiotic -T basada en dicho antibiótico.

Según el proveedor, la columna Chirobiotic T permite operar en multitud de modos cromatográficos: fase normal, fase inversa, modo orgánico polar (POM) y modo iónico polar (PIM), sin embargo los aminoácidos en forma iónica son insolubles en disolventes apolares y por tanto no pueden analizarse en modo normal, así pues se optó por utilizar disolventes polares en la optimización de la separación cromatográfica quiral. De acuerdo con las especificaciones de la columna, la fase estacionaria quiral de Teicoplanina es compatible con todo tipo de disolventes y disoluciones reguladoras. El parámetro más crítico de operación es el pH, pudiendo trabajar en el intervalo comprendido entre 3.8 y 6.8. El caudal de trabajo escogido fue de $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, al cual no se alcanzaban altas presiones en cabeza de columna, ya que no es aconsejable superar los 3500 psi (240 bar) de presión para preservar la integridad de la fase estacionaria.

Con el objeto de establecer la longitud de onda óptima de detección en la separación cromatográfica de los enantiómeros de los aminoácidos escogidos en el estudio, tirosina, fenilalanina y triptófano, se registraron los espectros de absorción en el intervalo de 200-400 nm obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 46. Tal y como se aprecia en dicha figura, el Trp muestra una absorción alta entorno a

220 nm, sin embargo la Tyr presenta una absorción bastante menor y la Phe no presenta casi absorción. Dada la dificultad de realizar medidas espectrofotométricas a longitudes de onda bajas con algunos disolventes orgánicos como el metanol o acetonitrilo, se escogió como longitud de onda de compromiso 260 nm, en la cual los tres aminoácidos presentaban absorción.

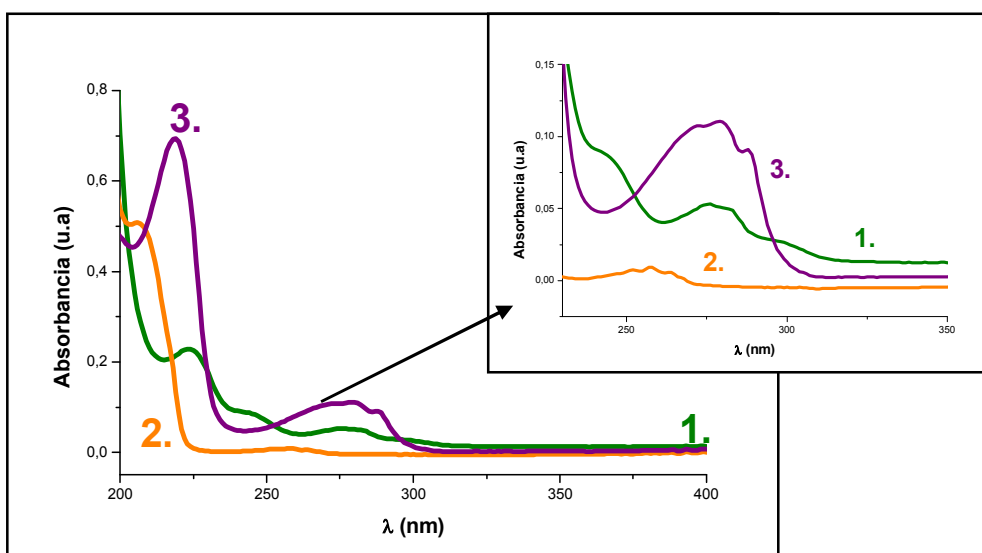


Figura 46. Espectros de absorción UV-vis: 1). 5 mg·L⁻¹ de tirosina, 2). 10 mg·L⁻¹ de fenilalanina y 3). 5 mg·L⁻¹ de triptófano registrados en metanol, temperatura ambiente.

Dada la complejidad del mecanismo de separación quiral, se decidió comenzar los ensayos basándose en estudios previos realizados en el grupo de investigación por Chacón y col (450). Estos estudios revelaron que el uso de fases móviles basadas en acetonitrilo/tampón acetato amónico 20 mM, tal y como recomienda el protocolo facilitado por el proveedor de la CSP, proporcionaban picos no resueltos y prácticamente sin retención en la columna, mientras que si el acetonitrilo era sustituido por metanol, los enantiómeros empezaban a separarse. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se decidió llevar a cabo un estudio sistemático de las variables que afectaban a la resolución así como a la enantioselectividad de los enantiómeros de los aminoácidos calculada según la ecuación:

Ec. [15]

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

En primer lugar y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3 de la parte experimental, se estudió la influencia de la fuerza iónica del componente acuoso de la fase móvil en la enantioselectividad ensayando fases móviles de distinto contenido en metanol, y acetato amónico 20 mM a pH 7. La tabla 66 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 66. Resultados de los ensayos preliminares con fases móviles de distinta proporción metanol/tampón acetato amónico 20 mM pH 7.

Analito.	Fase móvil	α	R_s^*
Tyr	metanol/acetato	1.70	0.76
Phe	amónico 20 mM pH	1.63	0.94
Trp	7 (90:10, v/v)	1.57	0.80
Tyr	metanol/acetato	1.87	0.80
Phe	amónico 20 mM pH	1.83	0.81
Trp	7 (85:15, v/v)	1.74	0.47
Tyr	metanol/acetato	1.10	0.30
Phe	amónico 20 mM pH	1	0.30
Trp	7 (60:40, v/v)	1.05	0.30

** A efectos de cálculo del modelo matemático, en aquellos casos en lo que el par de enantiómeros no esté resuelto, el valor de R_s asignado es de 0.30.*

Los estudios realizados mostraron que en general, un aumento en la proporción de modificador orgánico en la fase móvil conlleva un aumento tanto de la enantioselectividad como de la resolución. A pesar que a partir de un porcentaje del 60 % v/v de metanol la enantioselectividad comienza a ser mayor que la unidad, los enantiómeros no se empiezan a considerar resueltos a línea base hasta un contenido de MeOH del 85 % v/v.

Los siguientes ensayos se basaron en el estudio de la influencia de la naturaleza de la disolución reguladora de la fase móvil sobre dichas respuestas, para ello se ensayaron fases que contenían distintas proporciones de MeOH utilizando en este caso como disolución reguladora TEA al 0.1 % ajustada a pH 4 con ácido acético. Para ello, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, únicamente se decidió ensayar las fases móviles con mayor porcentaje de metanol. La tabla 67 muestra la variación de la enantioselectividad y la resolución en dichos ensayos.

Tabla 67. Resultados de los ensayos preliminares con fases móviles de distinta proporción metanol/disolución de TEA 0.1 % pH 4.

Analito.	Fase móvil	α	R_s
Tyr	metanol/TEA 0.1% pH 4 (90:10, v/v)	1.90	2.10
Phe		1.96	2.14
Trp		1.99	2.08
Tyr	metanol/TEA/ Ácido acético (100:0.1:0.1, v/v/v)	1.87	2.31
Phe		1.86	2.43
Trp		1.91	2.15

Los resultados obtenidos, muestran claramente la influencia de la trietilamina en la fase móvil, causante de la importante mejora en la resolución de los enantiómeros. A pesar de que los mecanismos de separación quiral son muy complejos, a la vista de los resultados obtenidos, parece que las moléculas de trietilamina bloquean los grupos carboxílicos de la teicoplanina mediante la formación de pares iónicos, reduciendo así las interacciones repulsivas entre estos grupos y los grupos carboxílicos de los aminoácidos. De este modo las interacciones iónicas, que parecen ser las responsables del reconocimiento quiral, resultan más eficientes, aumentando la separación entre los enantiómeros y obteniendo así valores de enantioresoluciones más altos. Beesley y col. (451) sugieren que el reconocimiento quiral de aminoácidos en fases estacionarias de teicoplanina con dos mecanismos de adsorción, uno de baja energía relacionado con las interacciones débiles tanto polares como apolares y uno de alta energía relacionado con las interacciones iónicas más fuertes.

Por último, se evaluaron fases móviles que únicamente contenían metanol y agua milli-Q sin la presencia de ningún medio tamponado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 68. A la vista de los resultados obtenidos se puede comprobar que a pesar de que los valores de enantioselectividad son bastante similares a los obtenidos cuando se usaba tampón acetato amónico en la fase móvil, los valores de resolución vuelven a ser mucho más elevados, y similares a los obtenidos en los ensayos realizados añadiendo trietilamina en la fase móvil. Cavazzini y col (452) sugieren que este efecto del tampón acetato en la enantioresolución parece ser debido a la competencia existente entre los enantiómeros y los iones acetato por los sitios de reconocimiento quiral de la teicoplanina. Dichos iones actúan como especies capaces de interaccionar fuertemente con la cavidad aglicona de la teicoplanina. Dicha

competencia con los enantiómeros de los aminoácidos, hace que las interacciones responsables del reconocimiento quiral disminuyan y por tanto la enantioresolución disminuya en presencia de acetato amónico.

Tabla 68. Resultados de los ensayos preliminares con fases móviles de distinta proporción metanol/agua milli-Q

Analito	Fase móvil	α	R_s^*
Tyr	metanol/agua (20:90, v/v)	1	0.30
Phe		1.02	0.30
Trp		1.05	0.30
Tyr	metanol/agua (90:10, v/v)	1.93	2.04
Phe		1.92	2.06
Trp		1.86	2.01
Tyr	metanol (100, v/v)	2.06	2.40
Phe		2.01	2.13
Trp		1.92	2.19

** A efectos de cálculo del modelo matemático, en aquellos casos en lo que el par de enantiómeros no esté resuelto, el valor de R_s asignado es de 0.30.*

III.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LOS ENANTIÓMEROS DE LOS AMINOÁCIDOS MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Los ensayos preliminares de la separación cromatográfica de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano mostraron que, en general, para conseguir valores de enantioselectividad y de resolución enantiomérica adecuados, se necesitaban porcentajes de metanol altos en la fase móvil. Además se pudo comprobar que los enantiómeros quedaban resueltos en tiempos de análisis inferiores a 5 minutos y que la teicoplanina mostraba una selectividad muy parecida para todos los analitos estudiados.

Con el fin de establecer una relación entre los factores estudiados en los ensayos preliminares y ver el peso de los mismos en la enantioselectividad y resolución obtenidas, se hizo uso de métodos quimiométricos de diseño experimental y optimización mediante superficies de respuestas experimentales.

Así pues, para identificar las variables que más afectaban tanto a la enantioselectividad como a la resolución de los pares de enantiómeros de los aminoácidos estudiados y estudiar la posibilidad de alcanzar unas condiciones en las que llevar a cabo la separación simultánea de los seis enantiómeros, se optó por dos diseños exploratorios de dos factores dos niveles con un total de 4 experimentos cada uno, dónde se estudió la influencia de los factores evaluados en los ensayos preliminares en la separación de los enantiómeros, estableciendo los siguientes niveles para cada uno de los factores estudiados:

- Porcentaje de metanol de la fase móvil: 90 % y 100 %
- pH del medio: sin ajuste de pH (agua), 0.1% TEA ajustada a pH=4 con ácido acético, tampón acetato amónico 20 mM pH 7. Esta variable se consideró ya que en los ensayos preliminares la presencia de disolución reguladora o no en la fase móvil presentaba una gran influencia sobre la enantioresolución.

Los diseños experimentales se normalizaron asignando los valores -1, y 1 a cada nivel de las variables estudiadas.

En los ensayos preliminares, se comprobó que la temperatura del laboratorio parecía influir ligeramente en los resultados obtenidos, por tanto, con el fin de obtener resultados reproducibles, se decidió termostatar el sistema fijando la temperatura de la columna y la fase móvil en 20 °C. La información más importante de los diseños planteados, así como los valores normalizados de los factores experimentales evaluados se recogen en las tablas 69 y 70.

Tabla 69. Resultados del diseño experimental de dos factores dos niveles utilizando AcNH₄.

Exp.	Metanol (%)		Disolución reguladora		Tirosina		Fenilalanina		Tryptófano	
					α	R_s	α	R_s	α	R_s
1	90	-1	AcNH ₄ 20 mM pH 7	1	1.79	0.81	1.65	0.99	1.63	0.86
2	100	1	0.1% AcNH ₄ 20 mM pH 7	1	1.85	1.95	1.86	1.90	1.84	1.89
3	90	-1	Sin tampón	-1	1.96	2.80	1.99	2.65	1.95	2.73
4	100	1	Sin tampón	-1	2.07	2.82	2.05	2.69	1.98	2.69

Tabla 70. Resultados del diseño experimental de dos factores dos niveles utilizando TEAA

Exp.	Metanol (%)		Disolución reguladora		Tirosina		Fenilalanina		Triptófano	
					α	Rs	α	Rs	α	Rs
1	100	1	0.1 % TEA 0.1 % Ácido acético	1	1.93	2.87	1.99	2.77	2.01	2.79
2	90	-1	Sin tampón	-1	1.96	2.80	1.99	2.65	1.95	2.73
3	100	1	Sin tampón	-1	2.07	2.82	2.05	2.69	1.98	2.69
4	90	-1	0.1 % TEA pH 4	1	1.94	2.87	1.99	2.68	1.99	2.65

Planteados los diseños experimentales, se registraron los cromatogramas correspondientes a cada una de las 4 fases móviles ensayadas en cada uno de ellos, calculando la enantioselectividad según la Ec. [15] y la resolución entre enantiómeros según la Ec. [8]. Al igual que se hizo con los diseños correspondientes a los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, de los resultados obtenidos en los experimentos de cada uno de los diseños experimentales planteados, se pudieron obtener las ecuaciones que definen las superficies de respuesta experimental. El análisis de los diseños se realizó mediante el programa estadístico **STATGRAPHICS PLUS Versión 5.0**. Así, la variación de la enantioselectividad y de la resolución del par enantiomérico de cada uno de los aminoácidos en función de los factores estudiados se ajustó a una ecuación polinómica del siguiente tipo:

Ec. [16]

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_1x_2$$

Dónde:

x_1 = proporción de metanol en la fase móvil.

x_2 = presencia o no de disolución reguladora en la fase móvil.

y = resolución enantiomérica o enantioselectividad.

En la tabla 71, se muestran los valores de los coeficientes experimentales obtenidos (a_0 - a_3) en los dos diseños experimentales realizados para cada uno de los aminoácidos. En este caso, como únicamente se han considerado dos niveles y dos factores y no se han realizado réplicas, no se tienen los suficientes grados de libertad para predecir la incertidumbre del modelo y demás parámetros relacionados con el error, por tanto no se dispone de los coeficientes de correlación múltiple (R^2) de los modelos, valores-P o errores de estimación estándar (SEE).

Tabla 71. Coeficientes de ajuste experimentales obtenidos en los modelos matemáticos según la ecuación 16 en los dos diseños experimentales utilizados.

Parámetro	a_0	a_1	a_2	a_3
tirosina (en presencia de AcNH_4)				
α	1.92	0.04	-0.09	-0.01
R_s	2.09	0.29	-0.71	0.28
fenilalanina (en presencia de AcNH_4)				
α	1.88	0.06	-0.13	0.04
R_s	2.05	0.24	-0.61	0.22
triptófano (en presencia de AcNH_4)				
α	1.85	0.06	-0.11	0.04
R_s	2.04	0.25	-0.66	0.27
tirosina (en presencia de TEAA)				
α	1.97	0.02	-0.04	-0.03
R_s	2.84	0.005	0.03	-0.005
fenilalanina (en presencia de TEAA)				
α	2.00	0.03	-0.01	-0.03
R_s	2.76	0.03	-0.04	0.02
triptófano (en presencia de TEAA)				
α	2.00	0.03	-0.01	-0.02
R_s	2.76	0.04	-0.05	0.03

A modo de ejemplo, en la figura 47 y 48 se representan los gráficos de Pareto obtenidos en el diseño experimental con acetato amónico como regulador y las superficies de respuesta obtenidas en el diseño experimental en el que se utiliza TEAA respectivamente.

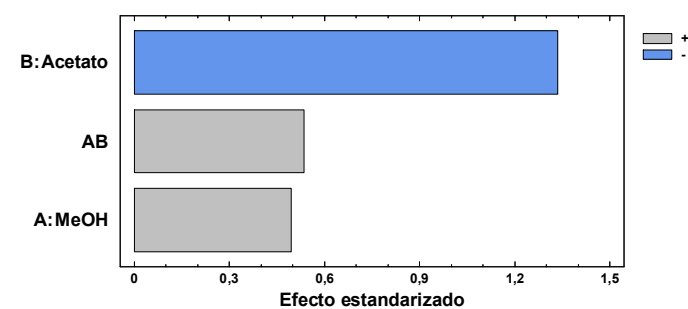
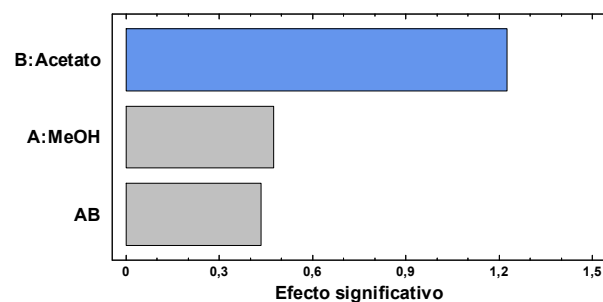
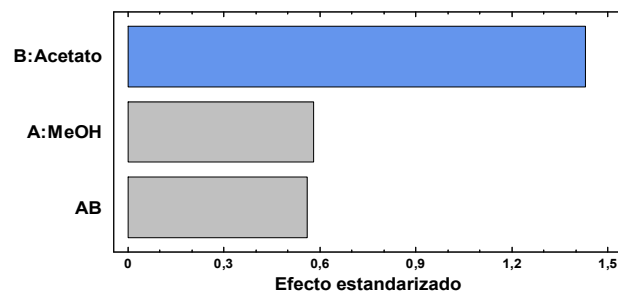
En general, como se observa en la figura 47, tanto la enantioselectividad como la resolución de los enantiómeros depende en gran medida de la presencia de acetato amónico en la fase móvil, es decir, en aquellas fases móviles en las que se regula el pH haciendo uso de este tampón, ambas respuestas disminuyen. Por otra parte el metanol presenta el efecto contrario, cuanto mayor es la proporción del mismo, tanto la enantioselectividad como la resolución enantiomérica adquieren valores más altos. Cabe destacar que en el espacio muestral estudiado, la interacción metanol* AcNH_4 , presenta en mayor o menor medida un efecto positivo (excepto para la enantioselectividad de la tirosina) en las dos respuestas estudiadas.

a)

b)

c)

1.



2.

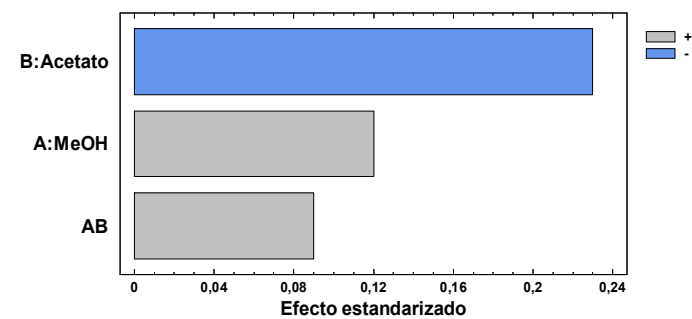
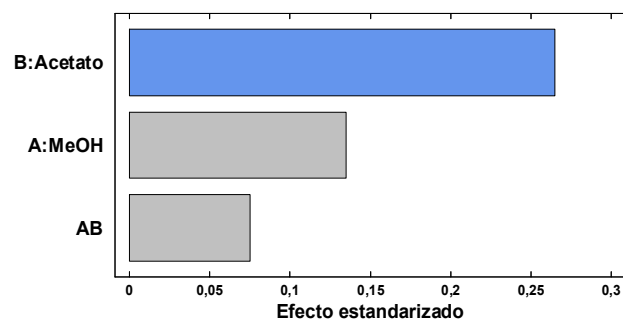
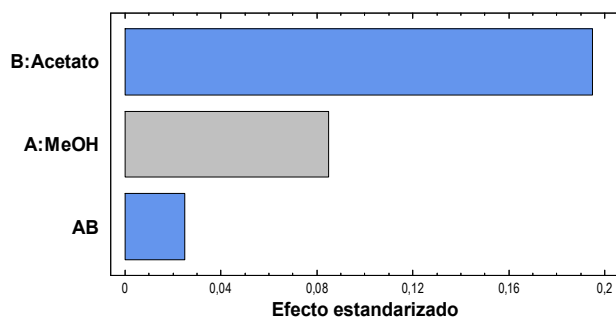
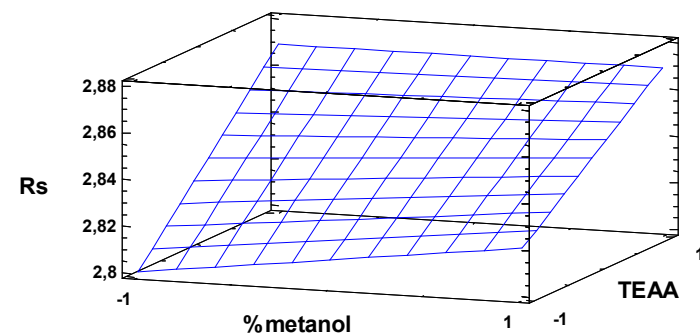
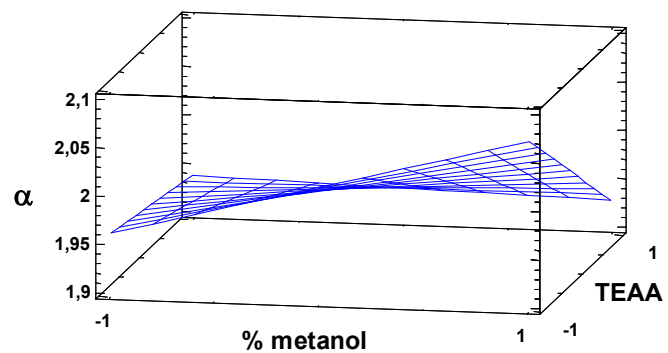
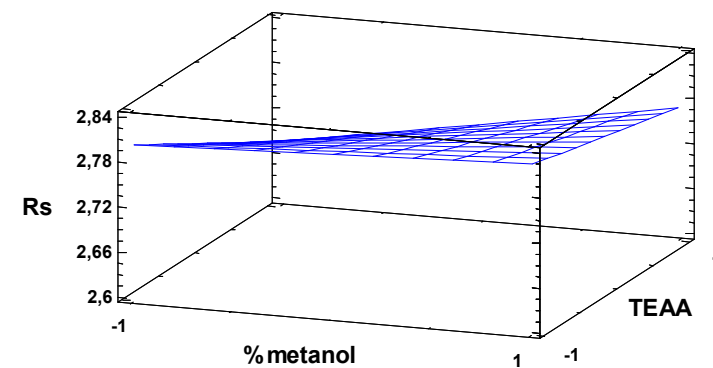
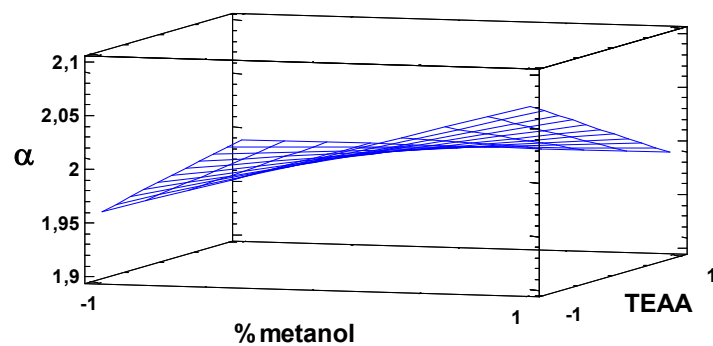


Figura 47. Gráficos de Pareto. Representación del peso de cada factor en la 1. Enantioselectividad, 2. Resolución enantiomérica de la a.) Tirosina, b.) Fenilalanina, c.) Triptófano en el diseño experimental efectuado en presencia de acetato amónico

a)



b)



c)

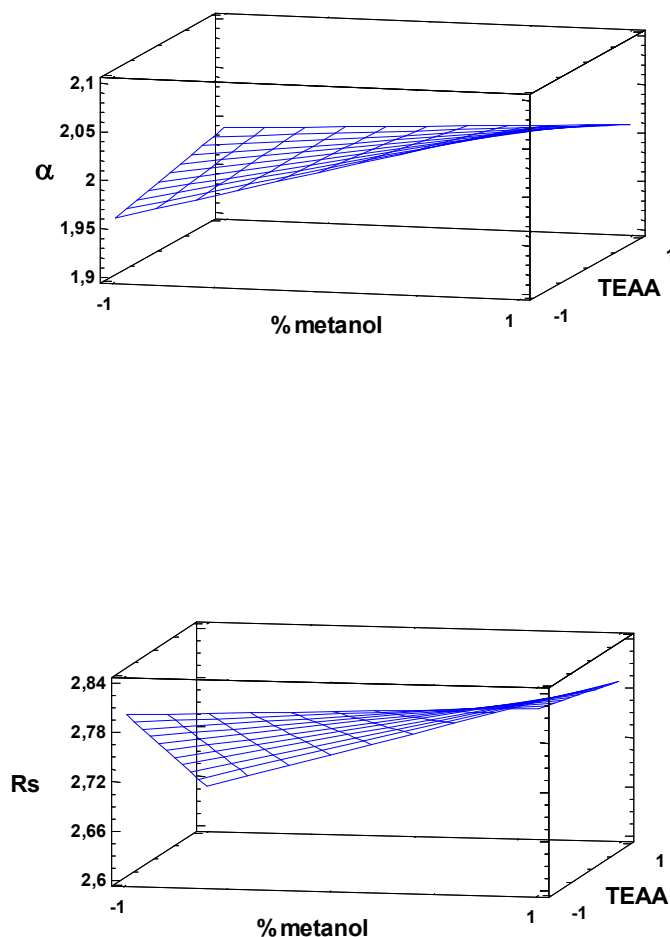


Figura 48. Superficie de respuesta estimada para a.) Tirosina, b.) Fenilalanina, c.) Triptófano obtenidas en presencia de TEAA en la disolución reguladora.

Las superficies de respuesta de la figura 48 obtenidas en la presencia de TEAA, muestran que tanto en la enantioselectividad como en la resolución enantiomérica, el metanol tiene un efecto positivo importante, es decir fases móviles prácticamente metanólicas proporcionan valores elevados de ambas respuestas. Tal y como se comprobó en los ensayos previos, los valores de enantioselectividad y resolución enantiomérica son mayores que los obtenidos en presencia de acetato amónico. Sin embargo, y a excepción de la variación de la enantioresolución de la tirosina, la presencia de TEAA parece tener un efecto negativo en ambas respuestas, obteniendo valores menores en presencia de esta amina en la fase móvil. La marcada

torsión que presenta la forma de dichas superficies indica que existe una importante interacción metanol*TEAA en ambas respuestas.

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de separación y teniendo en cuenta las respuestas experimentales obtenidas, se utilizó el análisis multirespuesta como herramienta de optimización. El criterio seleccionado fue que la fase móvil debía maximizar tanto la enantioselectividad como la enantioresolución. En todos los casos, la fase móvil que proporcionaba los valores más altos en ambas respuestas, era una fase móvil de composición 100 % metanol sin la presencia de ningún tampón. Por otra parte estos diseños experimentales pusieron en evidencia la imposibilidad de obtener una fase móvil que consiguiese la separación conjunta de los seis enantiómeros en un solo análisis, de ahí que para llevar a cabo este tipo de determinaciones conjuntas se requiera un acoplamiento cromatográfico de tipo HPLC quiral-HPLC-quiral.

Dado que la separación cromatográfica primaria en fase inversa de los aminoácidos objeto de estudio requiere, en general, fases móviles que contengan tanto modificador orgánico como componente acuoso, y puesto que los valores de α y R_s se mantenían, con el fin de asegurar la compatibilidad de las fases móviles implicadas en el acoplamiento cromatográfico a desarrollar, se decidió llevar a cabo la separación de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano en una fase móvil de composición metanol/agua (90:10 v/v) bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.3. de la parte experimental.

En las condiciones seleccionadas, los enantiómeros de la tirosina eluyen a unos tiempos de retención de 1.87 y 2.83 minutos quedando resueltos a línea base con una resolución de 2.84 y una enantioselectividad de 1.95 ($R_{s\text{ACETATO}}$ predicha= 2.79 y α_{ACETATO} predicha= 1.96, $R_{s\text{TEAA}}$ predicha= 2.80 y α_{TEAA} predicha= 1.96). En el caso de la fenilalanina la resolución y la enantioselectividad obtenidas fueron 2.68 y 1.94 respectivamente ($R_{s\text{ACETATO}}$ predicha= 2.64 y α_{ACETATO} predicha= 1.99, $R_{s\text{TEAA}}$ predicha= 2.79 y α_{TEAA} predicha= 1.95) y los tiempos de retención para los enantiómeros fueron de 2.02 y 3.09 minutos. Finalmente para el triptófano, el primer enantiómero eluyó a un tiempo de retención de 2.15 minutos y el segundo a 3.34 minutos. La enantioselectividad y la resolución obtenidas fueron de 1.91 y 2.79 respectivamente ($R_{s\text{ACETATO}}$ predicha= 2.72 y α_{ACETATO} predicha= 1.94, $R_{s\text{TEAA}}$ predicha= 2.80 y α_{TEAA} predicha= 1.96). En la figura 49 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones óptimas de separación para cada uno de los aminoácidos.

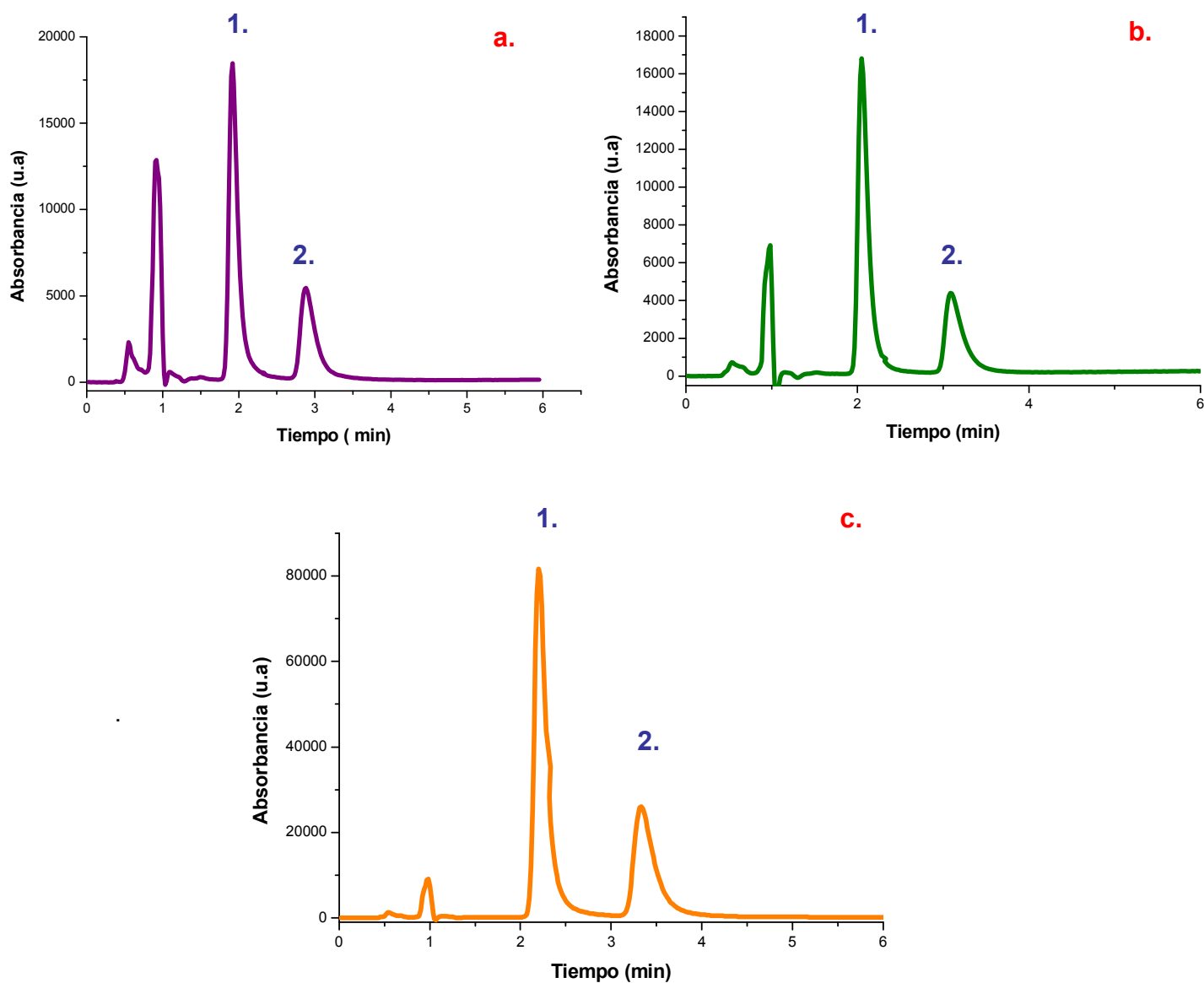


Figura 49. Cromatogramas de la separación quiral de 1. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del L-aminoácido y 2. $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del D-aminoácido.

a) Tirosina b) Fenilalanina c) Triptófano.

III.1.2.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS MÉTODOS DE SEPARACIÓN QUIRAL DE PATRONES INDIVIDUALES DE AMINOÁCIDOS

Las características analíticas del método cromatográfico de separación quiral de cada aminoácido, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo lineal y precisión, se establecieron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3. de la parte experimental. Los LOD y LOQ de cada enantiómeros. Al igual

que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y de la serotonina y sus precursores, se han determinado mediante el análisis de disoluciones cada vez más diluidas de cada enantiómero, hasta que la señal se confunde con el ruido, calculando el límite de detección como la concentración que corresponde con 3 veces la altura de la señal del ruido en las proximidades del pico cromatográfico y en el caso del límite de cuantificación con 10 veces la altura del ruido. Los intervalos lineales se han establecido analizando disoluciones patrón de los enantiómeros de cada aminoácido con concentraciones comprendidas en el intervalo 0.200-50 mg·L⁻¹ en el caso de los isómeros L-y D- de la tirosina y para los de la fenilalanina y triptófano 0.300-50 mg·L⁻¹ y 0.100-50 mg·L⁻¹ respectivamente. Los resultados se han analizado mediante regresión lineal utilizando las áreas de pico de cada uno de los enantiómeros. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la resolución, y de la enantioselectividad en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón de cada enantiómeros con una concentración de 10 mg·L⁻¹. Se han realizado 5 réplicas en el mismo día (n= 5) durante tres días consecutivos (N= 15).

En la tabla 72 se recogen las características analíticas de los métodos optimizados para la separación de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano mediante LC quiral directa. Tal y como se observa en los resultados mostrados en dicha tabla, todos los enantiómeros presentaron buena linealidad en los intervalos estudiados con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0.9920 y 0.9980. Los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero fueron menores o iguales a 0.085 mg L⁻¹ y 0.28 mg L⁻¹ respectivamente. Como se puede observar, la variación en el día fue inferior al 3.0 % y 3.3 % con respecto a la resolución, y a la enantioselectividad respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores estimados del 4.3 %, y 4.5 % para la Rs y α respectivamente.

De este modo, se ha puesto de manifiesto la eficacia y buena la precisión de los métodos de separación quiral propuestos para los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano.

Tabla 72. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de las formas enantioméricas L- y D- de la tirosina, fenilalanina y triptófano.

Aminoácido	Linealidad			LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)		Precisión en el mismo día (RSD, %)		Precisión entre días (RSD, %)	
	Concentración* (mg L ⁻¹)	R ²		L-	D-	L-	D-	R _s	α	R _s	α
		L-	D-								
tirosina	0.200-50.0	0.9920	0.9980	0.03		0.10		3	2	4.3	1.9
fenilalanina	0.300-50.0	0.9920	0.9970	0.08	0.085	0.26	0.28	2	3	3	4.5
triptófano	0.100-50.0	0.9960	0.9960	0.01		0.05		2.5	3.3	3.4	4

L- y D- hacen referencia al enantiómeros L- y D- de cada uno de los aminoácidos estudiados (n=10).

* referido a cada enantiómero

III.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL HPLC aquiral – HPLC quiral

Como se ha visto en el apartado anterior, la gran similitud de tiempos de retención en la separación quiral de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano hace que no sea posible un análisis simultáneo en modo isocrático de los seis enantiómeros por lo que la alternativa más adecuada para la resolución enantiomérica de dichos aminoácidos en un mismo análisis sería un acoplamiento cromatográfico de tipo HPLC aquiral- HPLC quiral.

Como quedó demostrado en el análisis quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, anteriormente expuesto, para el desarrollo de un acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral se requiere establecer las condiciones de separación ortogonales para los sistemas cromatográficos a acoplar, por lo que es necesario estudiar en primer lugar las condiciones de separación en la primera dimensión de los aminoácidos objeto de estudio, así como de sus principales productos de degradación *m*-tirosina, *o*-tirosina y 5-OH-triptófano.

Tal y como se reflejó en el apartado de antecedentes en el caso de aminoácidos, las opciones más adecuadas para llevar a cabo separaciones cromatográficas aquirales pasan por la utilización de la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) o la separación cromatográfica en fase inversa.

III.2.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PRIMARIA DE LOS AMINOÁCIDOS Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Como ya se ha comentado, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es la compatibilidad de las fases móviles utilizadas en cada dimensión. Por tanto con el fin de llevar a cabo el acoplamiento, se intentó buscar una fase móvil que permitiese llevar a cabo la separación primaria de la tirosina, fenilalanina y triptófano con tiempos de retención adecuados para realizar las transferencias a la columna quiral y que además permitiese la separación de los principales productos de degradación de dichos aminoácidos (*o*- y *m*- tirosina, y 5-OH-triptófano) no quirales. Puesto que la separación cromatográfica de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano en la CSP de teicoplanina se lleva a cabo utilizando una fase

móvil con un alto contenido en modificador orgánico (90 % metanol v/v), la separación de los aquiral de dichos aminoácidos en la primera dimensión idealmente se debería llevar a cabo en un medio con un alto contenido orgánico. Fué por esto que atendiendo a este requisito se decidió estudiar la posibilidad de separación aquiral de los aminoácidos objeto de estudio mediante cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), ya que esta modalidad de separación cromatográfica utiliza fases móviles con poco contenido acuoso. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Langrock y col. (453), y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1 de la parte experimental, el estudio se comenzó utilizando una columna Kinetex™ HILIC y una fase móvil de composición acetonitrilo/tampón acetato amónico 5 mM pH 5.5 (95:5, v/v), para ir variando sucesivamente la concentración de tampón, el pH del mismo y la proporción de acetonitrilo en la fase móvil, inyectando disoluciones patrón de cada aminoácido en concentración de 10 mg L⁻¹ fijando una longitud de onda de 260 nm y un caudal de 0.3 mL·min⁻¹. En estas condiciones se registraron los cromatogramas correspondientes y se estudió la variación en los tiempos de retención de cada uno de los aminoácidos en función de la composición de la fase móvil utilizada. Los resultados de dichos estudios preliminares se muestran en la tabla 73.

Tabla 73. Resultados de los ensayos preliminares de la separación cromatográfica de los aminoácidos en la columna Kinetex™ HILIC

Analito.	Fase móvil	t_r (min)
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 5.5 (95:5, v/v)	15.03
Phe		15.33
Trp		15.05
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 5.5 (75:25, v/v)	4.50
Phe		4.80
Trp		4.20
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 5.5 (50:50, v/v)	2.85
Phe		2.93
Trp		2.92
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 0.5 mM pH 5.5 (95:5, v/v)	15.87
Phe		15.18
Trp		12.87
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 6.5 (50:50, v/v)	2.83
Phe		3.00
Trp		2.90
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 6.5 (75:25, v/v)	4.12
Phe		4.15
Trp		3.87
Tyr	acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 6.5 (80:20, v/v)	5.70
Phe		5.70
Trp		5.13

En todos los experimentos llevados a cabo, se comprobó que el tiempo de retención aumentaba al aumentar la proporción de componente orgánico en la fase móvil, comportamiento esperado para compuestos polares o hidrofílicos en columnas cuyo mecanismo de retención es hidrofóbico. Por otra parte, los resultados parecen estar de acuerdo con los obtenidos por Chirit y col. (454) quienes sugieren que la retención de los aminoácidos en este tipo de fases estacionarias, aumenta al disminuir la concentración de disolución reguladora en la misma. A través de estos estudios se pudo comprobar que en muchos casos los tiempos de retención son muy altos obteniéndose picos cromatográficos con colas muy pronunciadas y achuras de pico muy elevadas. Además, como se puede observar en la figura 50, en la mayoría de los casos se obtienen picos cromatográficos muy próximos e incluso solapados que impiden una resolución cromatográfica óptima entre los aminoácidos estudiados.

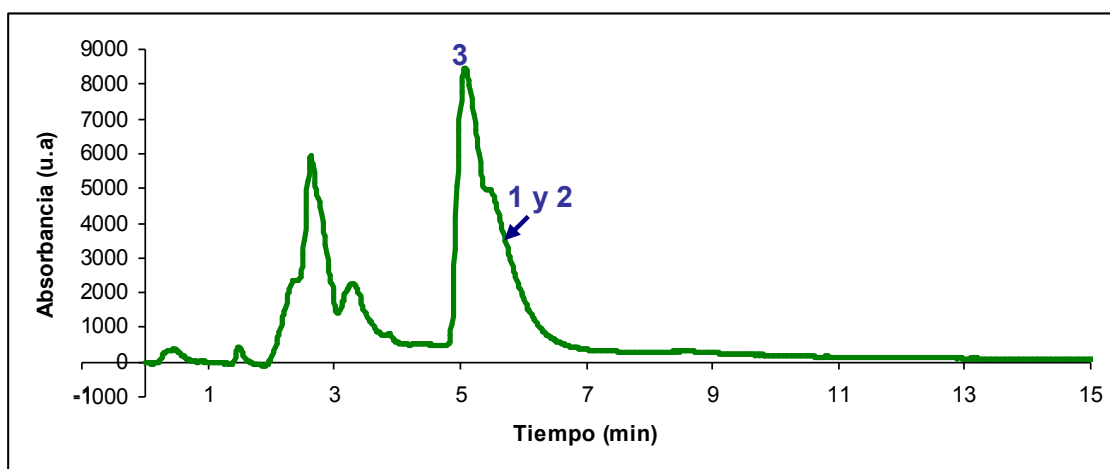


Figura 50. Cromatograma de la separación de 10 mg·L⁻¹ de 1. Tirosina 2. Fenilalanina 3. Triptófano, mediante una la columna KinetexTM HILIC y una fase móvil de composición acetonitrilo/acetato amónico 5 mM pH 6.5 (80:20, v/v)

Dado que la columna KinetexTM HILIC no presentaba una selectividad adecuada para los aminoácidos objeto de estudio, se optó por la utilización de una separación cromatográfica en fase inversa. En primer lugar se ensayó una columna Amide C₁₆, la cual presenta un mecanismo de retención en fase inversa, pero con una selectividad distinta que la que presentan las columnas C₁₈ convencionales, ya que la retención se encuentra modificada por la presencia de grupos polares amida (disminución de la hidrofobicidad). Los ensayos se comenzaron con una fase móvil similar a la utilizada en el caso de la columna KinetexTM HILIC, acetonitrilo/tampón acetato amónico 5 mM pH 6 (95:5, v/v) no observando retención de ningún analito.

Los ensayos se continuaron con una fase móvil de composición metanol /tampón acetato amónico 5 mM pH 6 (10:90, v/v), para ir variando sucesivamente la concentración de tampón, el pH del mismo y la proporción de metanol en la fase móvil, inyectando disoluciones patrón de cada aminoácido en concentración de 10 mg L⁻¹ preparadas en la fase móvil, fijando una longitud de onda de 260 nm y un caudal de 1 mL·min⁻¹. La variación en los tiempos de retención de cada uno de los aminoácidos en función de la composición de la fase móvil utilizada se presenta en la tabla 74.

Tabla 74. Resultados de los ensayos preliminares de la separación cromatográfica de los aminoácidos en la columna Discovery® Amide C₁₆

Analito.	Fase móvil	t_r (min)
Tyr	metanol/acetato amónico 5 mM pH 6 (10:90, v/v)	-
Phe		-
Trp		4.50
Tyr	metanol/acetato amónico 5 mM pH 6 (8:92, v/v)	2.54
Phe		3.39
Trp		5.99
Tyr	metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (8:92, v/v)	2.66
Phe		3.45
Trp		6.08
Tyr	metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (4:96, v/v)	3.53
Phe		4.80
Trp		10.83
Tyr	metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (4:96, v/v)	3.55
Phe		4.83
Trp		10.96
Tyr	metanol/acetato amónico 20 mM pH 4 (4:96, v/v)	3.60
Phe		4.90
Trp		10.99

Los resultados de dicha tabla demuestran que para lograr una separación conjunta de la tirosina, fenilalanina y triptófano se requieren fases móviles prácticamente acuosas (3-4% metanol). Por otra parte, la concentración de tampón no parece un factor influyente en la retención de los analitos, pero si en la forma de los picos cromatográficos, ya que a concentraciones bajas aparecían picos desdoblados debido a los equilibrios ácido-base entre las dos formas cargadas de los aminoácidos. En cuanto al pH, los resultados obtenidos a pH 4 ó 6 son bastante similares.

A pesar que la columna mostraba gran eficacia y tiempos de análisis cortos, la separación entre la tirosina y la fenilalanina (diferencia de tiempos de retención de aproximadamente un minuto), no resultaba suficiente como para realizar las transferencias en el caso del acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral, pues como ya

se ha comentado, el intervalo de tiempo entre los dos primeros aminoácidos en la columna primaria debe ser lo suficientemente amplio como para permitir la elución de los enantiómeros de la tirosina en la columna quiral, una posterior estabilización de la CSP con la fase móvil, realizar la transferencia de la fenilalanina y llevar a cabo la separación de sus enantiómeros. Por tanto, estos estudios previos mostraron que la columna Discovery® Amide C₁₆ tampoco resultaba adecuada para realizar el acoplamiento cromatográfico. En la figura 51 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos en estos estudios.

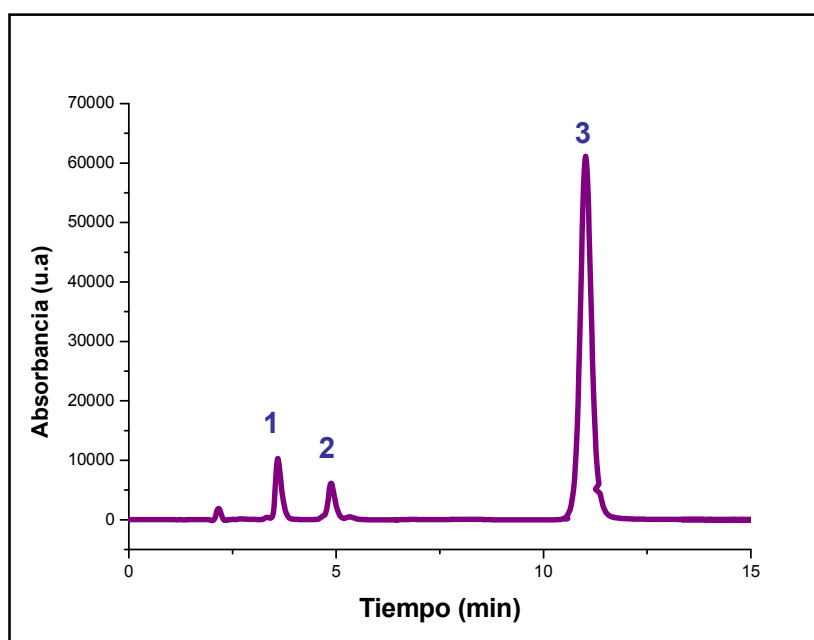


Figura 51. Cromatograma de la separación de 10 mg·L⁻¹ de 1. Tirosina 2. Fenilalanina 3. Triptófano, mediante una la columna Discovery® Amide C₁₆ y una fase móvil de composición metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (3:97, v/v)

Continuando con el proceso de optimización, se ensayaron dos columnas de tipo C₁₈ convencionales, C₁₈-Luna y la Atlantis dC₁₈ esta última caracterizada por ser una fase estacionaria compuesta de ligandos C₁₈ difuncionalmente unidos. La sistemática de los ensayos con dichas columnas fue similar a la seguida en los casos anteriores. Los ensayos se comenzaron con fases móviles de alto contenido en metanol (90%) /tampón acetato amónico 20 mM pH 6, pH cercano al punto isoeléctrico de los tres aminoácidos (5.63, 5.91, 5.88 para la tirosina, fenilalanina y triptófano respectivamente).

Los primeros ensayos revelaron que para obtener retención en la columna de al menos uno de los aminoácidos era necesario bajar la proporción de modificador

orgánico en la fase móvil hasta un 50 %. La variación en los tiempos de los tiempos de retención corregidos de cada uno de los aminoácidos en cada columna en función de la composición de la fase móvil utilizada se presenta en la tabla 75.

Tabla 75. Resultados de los ensayos preliminares de la separación cromatográfica de los aminoácidos en la columna C₁₈-Luna y Atlantis dC₁₈

Fase móvil	C₁₈-Luna			Atlantis dC₁₈		
	t_r' (min)			t_r' (min)		
	Tyr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (50:50, v/v)	-	0.52	0.63	0.18	0.70	1.71
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (40:60, v/v)	0.08	0.68	1	0.23	0.84	2.09
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (30:70, v/v)	0.20	1.23	2.12	0.30	1.20	2.69
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (20:80, v/v)	0.52	2.30	4.32	0.47	2.40	4.28
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (15:85, v/v)	0.58	2.76	5.37	0.62	3.00	5.70
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (10:90, v/v)	0.94	4.03	8.37	0.97	4.25	8.59
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (8:92, v/v)	1.22	4.72	10.27	1.30	5.29	10.79
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94, v/v)	1.55	5.80	13.20	1.57	5.87	14.27
metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (5:95, v/v)	1.85	6.67	15.88	1.88	7.04	16.56
metanol/acetato amónico 40 mM pH 6 (5:95, v/v)	1.83	6.62	15.50	1.87	6.99	16.32
metanol/acetato amónico 10 mM pH 6 (5:95, v/v)	1.82	6.55	15.25	1.84	7.03	16.44
metanol/acetato amónico 20 mM pH 4 (5:95, v/v)	1.87	6.70	15.99	1.89	7.10	16.70

Los resultados de dicha tabla ponen de manifiesto el comportamiento similar que muestran ambas columnas con respecto a la variación de la fase móvil. En general una disminución de la cantidad de metanol, mejora considerablemente la separación cromatográfica entre los tres aminoácidos. Un contenido de metanol en la fase móvil del 5-6 % permite una separación suficiente entre el pico cromatográfico de la tirosina y la fenilalanina para realizar ambas transferencias a la columna quiral. Al variar la concentración de tampón y el pH del mismo, los resultados obtenidos son muy similares, por lo que se decidió fijar la concentración de tampón acetato en 20 mM para evitar el desdoblamiento de los picos causados por los equilibrios ácido-base de los analitos y un pH 6, para trabajar a un pH próximo al punto isoelectrico de los mismos.

La columna Atlantis dC₁₈ parecía proporcionar picos más estrechos que la columna C₁₈-Luna por lo que se calculó el número de platos teóricos con respecto al

último compuesto eluído (Trp) para una fase móvil de alto contenido acuoso (metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94, v/v)) mediante la ecuación:

Ec. [17]

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

Dónde L es la longitud de la columna, H la altura del plato teórico, t_r el tiempo de retención y w la anchura del pico cromatográfico en la base. El número de platos teóricos obtenido fue de 882 y 2980 en la columna C₁₈-Luna y Atlantis dC₁₈ respectivamente, es decir, esta última columna presentaba mucha mayor eficacia que la columna C₁₈-Luna. En la tabla 76 y en el apartado 3.4.1. del procedimiento experimental se presentan las condiciones de separación escogidas finalmente para el análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida en fase inversa.

Tabla 76. Condiciones de la determinación cromatográfica de los aminoácidos en fase inversa

Columna cromatográfica	Atlantis dC ₁₈ , 150X4.60 mm precolumna Pelliguard SUPERCOSIL-C ₁₈
Fase móvil	metanol -tampón acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94 v/v)
Longitud de onda (nm)	260
Temperatura (°C)	20 °C

Bajo estas condiciones, los tiempos de retención obtenidos fueron de 4.13 min, 7.76 min y 16.66 min en el caso de la tirosina, fenilalanina y triptófano respectivamente, suficientes para poder acoplar esta separación aquiral a una segunda dimensión de separación quiral de estos aminoácidos.

Además en estas condiciones, también se pueden separar los productos de degradación de los aminoácidos objeto de estudio, siendo los tiempos de retención de la *m*-tirosina y *o*-tirosina de 5.35 min y 6.93 min respectivamente, mientras que el del 5-OH-triptófano fue de 8.71 min. En la figura 52 se muestra un cromatograma obtenido en las condiciones óptimas de separación.

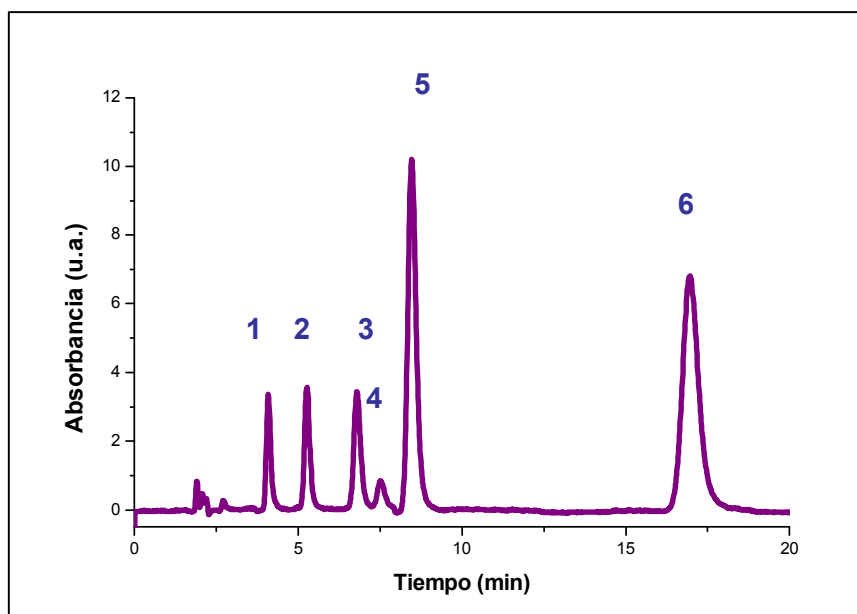


Figura 52. Cromatograma de la separación de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1. Tirosina 2. *m*-Tirosina 3. *o*-Tirosina 4. Fenilalanina 5. 5-OHTriptófano 6. Triptófano, mediante una columna Atlantis dC₁₈ y una fase móvil de composición metanol/acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94, v/v)

III.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO CROMATOGRÁFICO BIDIMENSIONAL PARA EL ANÁLISIS QUIRAL DE AMINOÁCIDOS.

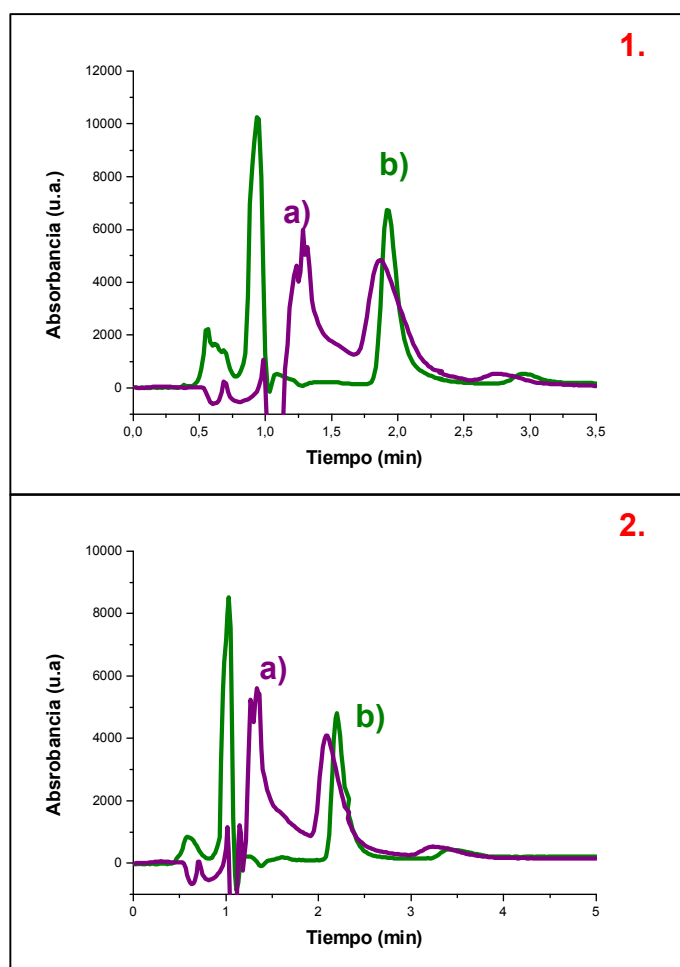
Al igual que en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, la separación enantiomérica de la tirosina, fenilalanina y triptófano mediante un acoplamiento cromatográfico de tipo HPLC quiral-HPLC quiral, implica el desarrollo de una metodología que permita separar los racematos de dichos aminoácidos de una mezcla compleja en la columna primaria, para posteriormente, y en un mismo análisis, transferir dichos picos cromatográficos a la CSP de teicoplanina mediante una válvula de desplazamiento (figura 18) y separar así los enantiómeros de los mismos mediante las condiciones expuestas en el apartado 3.4.2 de la parte experimental. Análogamente y siguiendo la misma sistemática que en el caso de los herbicidas, en primer lugar se efectuó un ensayo de ortogonalidad y compatibilidad de las fases móviles implicadas en el acoplamiento.

Para ello, se efectuó la separación quiral de los enantiómeros de los tres aminoácidos escogidos como marcadores del seguimiento de las posibles racemizaciones provocadas por el tratamiento mediante radiaciones ionizantes en alimentos listos para el consumo, en disoluciones que simulaban ser una fracción eluida de la columna cromatográfica primaria (Atlantis dC₁₈), es decir, preparadas en

la fase móvil utilizada en la separación primaria (metanol-tampón acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94, v/v)). Los resultados, así como los cromatogramas obtenidos en dichos estudios de ortogonalidad y compatibilidad se muestran en la tabla 77 y en la figura 53 respectivamente.

Tabla 77. Resultados del estudio de compatibilidad de fases móviles en el análisis de aminoácidos

Aminoácido	Muestra	t_{r1}' (min)	t_{r2}' (min)	R_s	α
tirosina	Disolución patrón	1.87	2.83	2.84	1.95
	Inyección en la fase móvil de la separación primaria	1.85	2.75	2.71	1.91
fenilalanina	Disolución patrón	2.02	3.09	2.68	1.94
	Inyección en la fase móvil de la separación primaria	2.00	3.03	2.50	1.89
triptófano	Disolución patrón	2.15	3.34	2.79	1.91
	Inyección en la fase móvil de la separación primaria	1.98	2.96	2.60	1.79



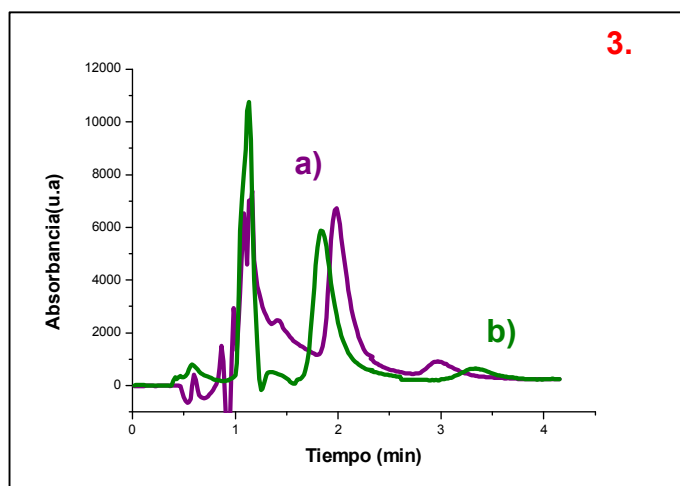


Figura 53. Cromatogramas de la separación quiral de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del L-aminoácido y $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del D-aminoácido 1.tirosina, 2. fenilalanina, 3. triptófano en diferentes condiciones:
a) Estudio de ortogonalidad y compatibilidad de fases móviles.
b) Muestra de referencia: condiciones de separación óptima de los aminoácidos (metanol/agua 90:10, v/v).

A la vista de los resultados obtenidos en estos ensayos, se pudo comprobar que a pesar de la diferente composición entre las fases móviles implicadas en el acoplamiento bidimensional, el cambio de fase móvil afectaba en poca medida a la separación de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano. Los tiempos de retención de los enantiómeros L- y D-, la anchura de pico, la resolución y la enantioselectividad se modifican ligeramente al cambiar de una fase a otra. Al igual que ocurría en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, se aprecia una leve pérdida de altura con respecto a la muestra de referencia y la aparición de pequeñas derivas en la línea base, hecho debido principalmente a la diferencia en la proporción de modificador orgánico en ambas dimensiones. La separación cromatográfica quiral se lleva a cabo utilizando una proporción de metanol del 90 %, mientras que la separación cromatográfica de los aminoácidos mediante cromatografía en fase inversa, requiere el uso de metanol en una proporción del 6 %, lo que justificaría las pequeñas derivas que se aprecian.

Comprobada la compatibilidad de las fases móviles empleadas en el acoplamiento y siguiendo la misma metodología descrita en el apartado I.5.2. para los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, se optimizó el tiempo de transferencia óptimo de cada uno de los aminoácidos a la columna quiral, en primer lugar para cada aminoácido de forma independiente y seguidamente de forma simultánea para los

tres. Para ello, disoluciones que contenían $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los enantiómeros L- y D- de cada aminoácido, se sometieron a una separación cromatográfica en la columna primaria a $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Posteriormente, y mediante la válvula de desplazamiento (figura 18) se fueron transfiriendo distintos volúmenes de los pico cromatográfico que contenían el analito a la columna secundaria de teicoplanina dónde los tres aminoácidos se separaron en sus dos formas enantioméricas a un caudal de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. En este caso y debido a que los picos cromatográficos de los aminoácidos eran bastante estrechos, se fueron transfiriendo distintas porciones de cada pico en intervalos de tiempo de 1 s, comenzando por la transferencia de 1 s de pico (volumen de $16 \text{ }\mu\text{L}$) y terminando por la transferencia de 7 s (volumen de 0.12 mL). Los resultados más significativos obtenidos en esta optimización para cada aminoácido se recogen en las tablas 78, 79 y 80.

Tabla 78. Resultados de la separación bidimensional de la tirosina.

Tiempo de transferencia (s)	Área L- (u.a.)	Área D- (u.a.)	ER	Rs	α
1	112	145	0.77	2.90	1.90
2	897	954	0.94	2.95	1.92
3	2633	3272	0.80	2.94	1.93
4	1945	3327	0.58	2.90	1.91
5	1395	4575	0.32	2.89	1.92
6	471	4710	0.10	2.88-	1.90
7	-	6545	0.00	-	-

Tabla 79. Resultados de la separación bidimensional de la fenilalanina

Tiempo de transferencia (s)	Área L- (u.a.)	Área D- (u.a.)	ER	Rs	α
1	38	47	0.80	2.99	1.90
2	1437	1671	0.86	3.03	1.91
3	1197	1901	0.63	2.95	1.88
4	576	1201	0.48	2.98	1.89
5	263	1146	0.23	2.97	1.89
6	-	1009	0.00	-	-
7	-	956	0.00	-	-

Tabla 80. Resultados de la separación bidimensional del triptófano

Tiempo de transferencia (s)	Área L- (u.a.)	Área D- (u.a.)	ER	Rs	α
1	608	707	0.86	2.65	1.90
2	3712	3787	0.98	2.64	1.90
3	5988	7837	0.76	2.66	1.92
4	3462	6296	0.55	2.60	1.89
5	232	1109	0.21	2.63	1.90
6	-	913	0.00	-	-
7	-	456	0.00	-	-

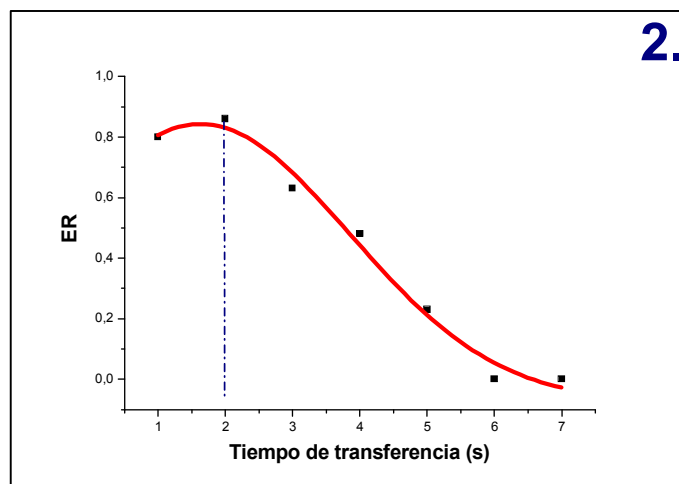
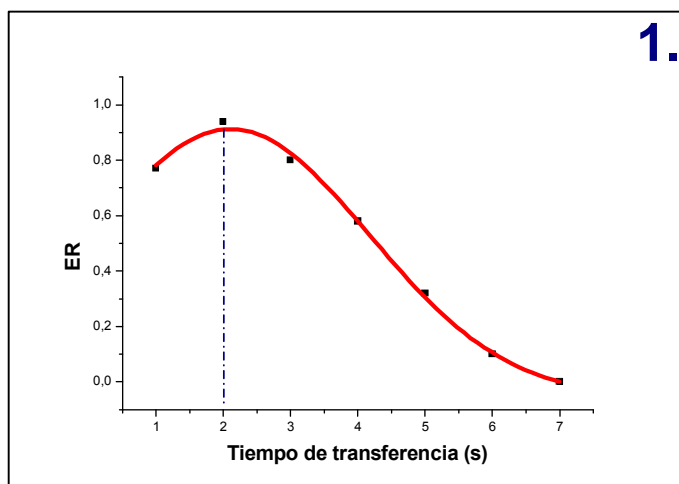
Los resultados obtenidos tanto para la tirosina como para la fenilalanina y triptófano muestran que para todas las fracciones transferidas los enantiómeros L- y D- son separadas con valores de resolución que oscilan entre 2.88 y 2.94 en el caso de la tirosina y 2.95-3.03 y 2.60-2.65 para la fenilalanina y triptófano respectivamente. Mientras que los valores de enantioselectividad obtenidos en todas las transferencias son bastante similares a los obtenidos en la separación enantiomérica de cada aminoácido efectuada de manera individual, los valores de resolución, sobretodo en el caso de la fenilalanina, son ligeramente superiores a los resultados obtenidos en los ensayos de ortogonalidad y compatibilidad de fases móviles. Esto se debe principalmente a que se observó una ligera disminución en el tiempo de retención del enantiómero L-, aumentando por tanto la separación entre ambos enantiómeros.

A pesar de la diferencia de composición de fases móviles en ambas dimensiones (la diferencia en la proporción de modificador orgánico utilizada es más de un 80%), la fuerza eluyente en la primera dimensión es más débil que en la segunda, lo que significa que el ensanchamiento del pico cromatográfico es prácticamente despreciable y por tanto, la resolución obtenida es independiente del volumen de inyección siempre y cuando no se produzca sobrecarga de la columna, de ahí que los valores de resolución permanezcan prácticamente constantes en todas las transferencias realizadas (392).

Tal y como se mencionó en el caso de los herbicidas, el tiempo de transferencia desde la columna primaria (C₁₈) a la columna secundaria (quiral) es el factor más importante a tener en cuenta en los acoplamientos cromatográficos

bidimensionales ya que de él depende la cantidad de analito transferido. A la vista de los resultados mostrados en las tablas 77-79, se observa que a medida que aumenta el tiempo de transferencia, el área del enantiómero L- va disminuyendo llegando incluso a desaparecer a los tiempos de transferencia más altos ensayados (6 y 7 s). Se comprobó que estos tiempos de transferencia altos, generaban un gran pico de inyección muy ancho que solapaba con el pico correspondiente a dicho enantiómero, de ahí que los valores de relación enantiomérica obtenidos variasen significativamente de una transferencia a otra.

Atendiendo a estos resultados, y llegando a un compromiso entre la sensibilidad (área de pico) y la obtención de valores de ER próximos a la unidad, el criterio de optimización del tiempo de transferencia fue distinto al utilizado en el caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. Para evitar la obtención de resultados irreproducibles a la hora de realizar el análisis de muestras de alimentos, se tomó como tiempo óptimo de transferencia aquel que proporcionase un valor de relación enantiomérica más próximo a la unidad y que además permitiese una determinación correcta del enantiómero L-. Con este fin se representaron los valores de relación enantiomérica obtenidos en cada transferencia frente al tiempo de transferencia de cada ensayo. Dichas representaciones proporcionaron curvas que se ajustaban a una función Gaussiana. Nuevamente, el máximo de cada una de estas curvas se tomó como tiempo de transferencia óptimo. En la figura 54 se recogen las representaciones de las funciones Gaussianas obtenidas en el proceso de optimización del tiempo de transferencia para la tirosina, fenilalanina y triptófano.



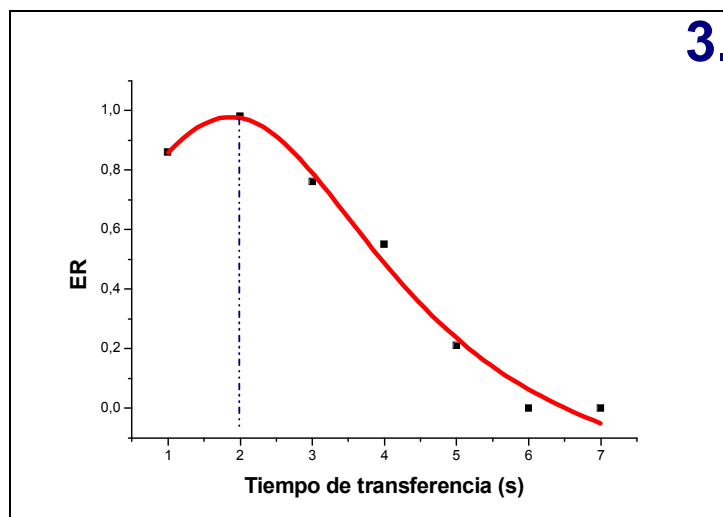


Figura 54. Representación del área de pico de cada enantiómero frente a la relación enantiomérica
1.tirosina 2.fenilalanina 3.triptófano

Mediante dichos estudios se pudo comprobar que para los tres aminoácidos estudiados el máximo de la función Gaussiana correspondía con un tiempo de transferencia aproximado de 2 s (aproximadamente un volumen de transferencia de 33 μL).

Una vez optimizadas todas las condiciones experimentales del acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral- HPLC quiral se procedió a la separación de los enantiómeros de los tres aminoácidos en continuo. Una vez chequeado el funcionamiento del sistema, se procedió al reajuste de los tiempos de transferencia con el fin de comprobar si la transferencia del pico de la tirosina influía en la transferencia del pico cromatográfico de la fenilalanina. Debido a la proximidad en los tiempos de retención de ambos aminoácidos, tiempos superiores a 2 segundos provocaban una desestabilización mayor en la columna primaria que imposibilitaba la transferencia de la fenilalanina. Las condiciones de elución y transferencia de cada uno de los aminoácidos se recogen en la tabla 81.

En la figura 55 se muestra el cromatograma de la separación cromatográfica mediante el acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral de una disolución patrón que contiene 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano, así como 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los productos de degradación de dichos aminoácidos.

Tabla 81. Condiciones de operación y posiciones de la válvula de desplazamiento utilizadas en la determinación quiral mediante LC-LC de la tirosina, fenilalanina y triptófano.

Tiempo (min)	Canal de la Bomba 1	Posición de la válvula	Evento
-30 a 0	A	1	Equilibrado de la columna CHIROBIOTIC-T con la fase móvil de análisis quiral de los tres aminoácidos
0	A	1	Inyección de la muestra en sistema 2
4.13	A	2	Transferencia de la tirosina
4.13 + 2 s	A	1	Fin de la transferencia
7.76	A	2	Transferencia de la fenilalanina
7.76 + 2 s	A	1	Fin de la transferencia
16.66	A	2	Transferencia del triptófano
16.66 + 2 s	A	1	Fin de la transferencia
30	A	1	Equilibrado de la columna CHIROBIOTIC-T para nuevo análisis
-	B		Lavado de la columna de teicoplanina con metanol

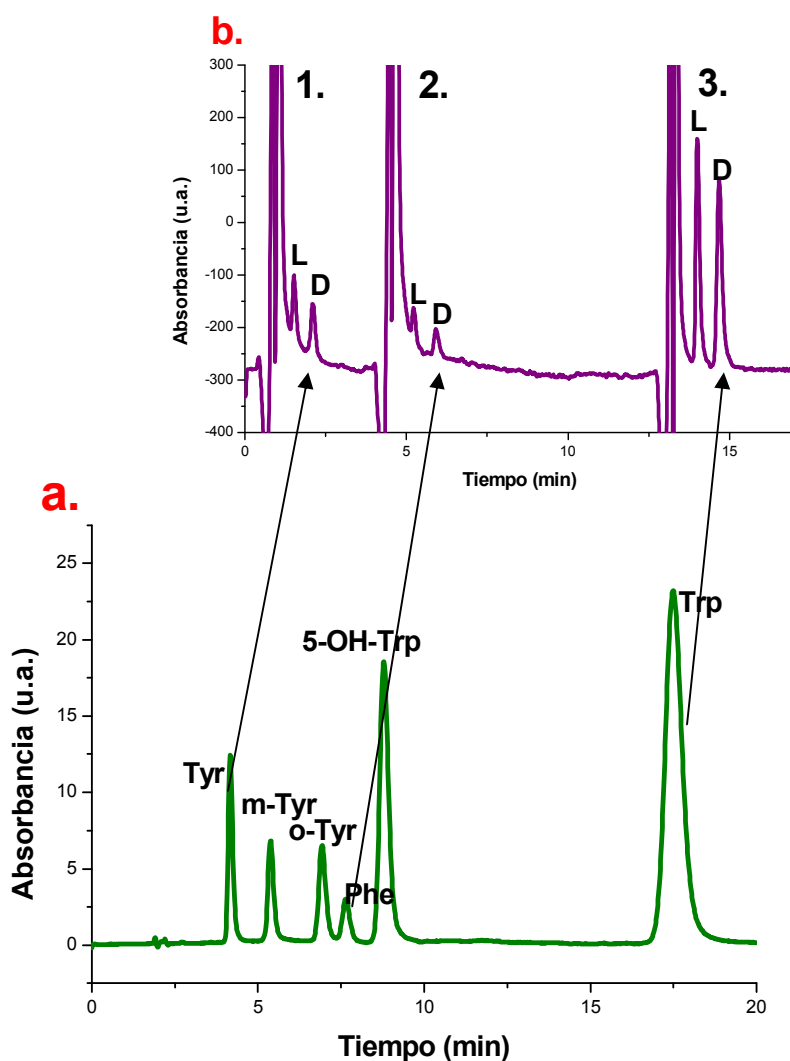


Figura 55. Cromatograma del acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral:
a) Separación en fase inversa de los aminoácidos y sus productos de degradación
b) Separación enantiomérica de la 1). tirosina, 2.) fenilalanina, 3.) triptófano

Tal y como se observa en dicha figura, al igual que en caso de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, la altura de los picos disminuye de forma considerable, disminuye la relación señal / ruido y por tanto, disminuye la sensibilidad respecto a los ensayos de separación quiral de los aminoácidos llevadas a cabo de forma independiente.

En este caso, tal y como se comentó en el apartado I.5.2. de los resultados de los herbicidas, la diferencia de caudales en ambas dimensiones produce cierta desestabilización, por otra parte, el efecto de dilución de la muestra que se produce en el momento de las transferencias es mucho menos marcado que en el caso de los herbicidas, ya que la diferencia de volúmenes inyectados en las transferencias (33 μL) y en los análisis independientes (20 μL) es de tan solo 13 μL . La pérdida de sensibilidad es debida a la limitación que existe en la utilización de tiempos de transferencia mayores a 2 segundos. Tiempos tan bajos, disminuyen la cantidad de analito transferida a la columna quiral y de ahí la notable pérdida de sensibilidad en el método.

III.2.2.1. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO BIDIMENSIONAL PARA EL ANÁLISIS QUIRAL DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO

En el cálculo de las características analíticas del acoplamiento cromatográfico HPLC quiral-HPLC quiral para la determinación quiral de la tirosina, fenilalanina y triptófano, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), intervalo lineal, se tuvo en cuenta tanto las características de la separación cromatográfica primaria como las del acoplamiento en conjunto, establecidas bajo las condiciones óptimas de separación y según el procedimiento 3.4.2. de la parte experimental. En las tablas 82 y 83 se recogen las características analíticas tanto de la separación primaria como del acoplamiento cromatográfico.

En el caso de la separación primaria de los aminoácidos estudiados y sus productos de degradación, la precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) del área de pico y del tiempo de retención corregido de cada aminoácido en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón con concentraciones de 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se han realizado 3 réplicas en el mismo día ($n= 3$) durante tres días consecutivos ($N= 9$).

Tal y como se observa en los resultados mostrados en la tabla 81, todos los aminoácidos estudiados y sus productos de degradación presentaron buena linealidad en los intervalos estudiados. Se estudiaron dos intervalos de concentraciones, uno más bajo que osciló entre 0.1 y 20 mg·L⁻¹ y otro que comprendía concentraciones más altas entre 25-400 mg·L⁻¹, con coeficientes de determinación (R²) comprendidos entre 0.9920 y 0.9985. Los límites de detección y de cuantificación para cada aminoácido fueron menores o iguales a 0.12 mg L⁻¹ y 0.4 mg L⁻¹ respectivamente. Como se puede observar, la variación en el día fue del orden del 4 %, y 0.3 % con respecto al área de pico y tiempo de retención corregido respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue similar a la obtenida en el mismo día, con valores estimados de RSD del 4.7 % y 0.8 % para el área de pico y tiempo de retención corregido.

Tabla 82. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de tirosina, fenilalanina y triptófano y sus productos de degradación cromatografía en fase inversa.

Analito	Linealidad		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Precisión mismo día (RSD, %)		Precisión entre días (RSD, %)	
	Concentración (mg L ⁻¹) ^a	R ²			Área ^b	t _r ' (min) ^c	Área ^b	t _r ' (min) ^c
tirosina	0.25-20	0.9940	0.06	0.20	3.5/1.9	0.1/0.2	4.7/2.2	0.4/0.6
	30-400	0.9980						
m-tirosina	0.25-20	0.9930	0.09	0.30	2.4/0.8	0.1/0.2	3.4/1.1	0.3/0.4
	25-100	0.9985						
o-tirosina	0.25-20	0.9968	0.08	0.28	0.9/0.5	0.1/0.1	3.7/1.5	0.4/0.2
	25-100	0.9970						
fenilalanina	0.5-20	0.9920	0.12	0.40	1.8/1.3	0.3/0.1	3.2/3.0	0.5/0.2
	25-400	0.9970						
5-OH-triptófano	0.1-20	0.9942	0.02	0.07	2/1.5	0.1/0.1	3.5/2.2	0.8/0.3
	25-400	0.9980						
triptófano	0.1-20	0.9980	0.03	0.12	4/1.4	0.3/0.1	4.5/3.0	0.5/0.2
	30-100	0.9980						

^a se realizan estudios a concentraciones bajas (n=8), y a altas (n=10).

^{b,c}, concentraciones de 5 mg·L⁻¹/ concentraciones de 50 mg·L⁻¹

Tabla 83. Características analíticas determinadas para disoluciones patrón de los racematos de la tirosina, fenilalanina y triptófano mediante el acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC-quiral.

Aminoácido	Linealidad				LOD (mg L ⁻¹)		LOQ (mg L ⁻¹)		Precisión mismo día (±RSD)		Precisión entre días (±RSD)	
	Concentración (mg L ⁻¹)*		R ²		L-	D-	L-	D-	ER	EF	ER	EF
	L-	D-	L-	D-								
tirosina	5-150	4-150	0.988	0.991	1	0.8	3.3	2.7	0.93 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.48 ± 0.03
fenilalanina	12-200	10-200	0.995	0.997	3	2	10	6.7	0.88 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.86 ± 0.06	0.47 ± 0.03
triptófano	3-50	2-50	0.996	0.996	0.3	0.2	1.1	0.6	0.93 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.94 ± 0.03	0.48 ± 0.02

L- y D- hacen referencia al enantiómeros L- y D- de cada uno de los aminoácidos estudiados

* (n=10) para tirosina y fenilalanina y (n=7) para el triptófano.

De este modo, se ha puesto de manifiesto la eficacia y buena la precisión del métodos de separación cromatográfica mediante fase inversa para la tirosina y sus productos de degradación *m*-tirosina y *o*-tirosina, fenilalanina y triptófano y su derivado hidroxilado, 5-hidroxitriptófano, el método propuesto, además, permite obtener buena sensibilidad en los intervalos estudiados.

Con respecto al acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral, tal y como se observa en los resultados mostrados en la tabla 82, se obtuvo buena linealidad en los intervalos estudiados, 4-150 mg L⁻¹ y 5-150 mg L⁻¹ para los enantiómeros de la tirosina, 10-200 mg L⁻¹ y 12-200 mg L⁻¹ en el caso de los enantiómeros de la fenilalanina y 3-50 mg L⁻¹ y 2-50 mg L⁻¹ para los enantiómeros del triptófano. Los coeficientes de determinación (R²) obtenidos estuvieron comprendidos entre 0.988 y 0.997, mientras que los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero fueron menores o iguales a 3 mg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹ respectivamente. La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) de la fracción y relación enantiomérica de cada aminoácido en el mismo día (*intra-day*) y entre días distintos (*inter-day*), inyectando disoluciones patrón 20 mg·L⁻¹ de cada enantiómero. Se han realizado 3 réplicas en el mismo día (n= 3) durante tres días consecutivos (N= 9). Como se puede observar, la variación en el día fue inferior al 4.0 %, y 3.0 % con respecto a la relación enantiomérica, y fracción enantiomérica respectivamente. La precisión obtenida entre días distintos fue en torno al 6.0 % y 3.0 % para ER y EF respectivamente.

Por otra parte, también se evaluó la precisión del método bidimensional cuando los aminoácidos no se encuentran en forma racémica y el enantiómero L- esta presente en distinta concentración a la del D-. Para ello se prepararon distintas proporciones enantioméricas L-/ D-comprendidas, manteniendo contante en todos los casos la concentración total del racémico en 50 mg·L⁻¹ para la tirosina y el triptófano y 75 mg·L⁻¹ en el caso de la fenilalanina. La precisión del método se evaluó en función del exceso enantiomérico, calculado según la expresión:

$$Ec. [18] \quad e.e. (\%) = \left(\frac{Area_{L-aa} - Area_{D-aa}}{Area_{L-aa} + Area_{D-aa}} \right) \times 100$$

La precisión se ha evaluado mediante la desviación estándar relativa (RSD) del exceso enantiomérico de cada aminoácido en el mismo día realizando un total 3 réplicas. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 84.

Tabla 84. Precisión del método de separación quiral bidimensional distintas proporciones L-/D-

Aminoácido	Precisión en el mismo día
	(\pmRSD)
	e.e. (%)
tirosina	91.1 \pm 0.9
fenilalanina	88.2 \pm 0.3
triptófano	98.5 \pm 0.2

A la vista de estos resultados se puede concluir que el método optimizado es bastante reproducible. Sin embargo, y como era de esperar, el acoplamiento bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral presenta menor sensibilidad que la separación quiral independiente de los tres aminoácidos ya que tan sólo una parte del pico es transferida a la segunda dimensión. Por otra parte los límites de detección que proporciona el método son aceptables a la hora de realizar determinaciones de dichos aminoácidos en muestras complejas.

III.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS POSIBLES TRANSFORMACIONES DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO EN ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO (RTE) TRATADOS CON RADIACIONES IONIZANTES

La utilidad del acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral optimizado se evaluó en el análisis de las posibles transformaciones de la tirosina, fenilalanina y triptófano en alimentos listos para el consumo que habían sido sometidos a radiaciones ionizantes. Las transformaciones que se tuvieron en cuenta en este estudio fueron tanto las posibles racemizaciones de los tres aminoácidos escogidos como marcadores, así como la formación de sus principales productos productos radiolíticos, *o*- y *m*- tirosina y 5-OH-triptófano.

Las dosis escogidas en el estudio fueron, 2 kGy como la dosis máxima necesaria para la eliminación en el alimento de la *L.monocytogenes* alcanzando así el FSO sin provocar cambios significativos en las propiedades organolépticas; dosis más bajas de 1 kGy y dosis más altas de 4, 6, y 8 kGy. En estas tesis se eligió 8 kGy como dosis máxima estudiada, ya que a pesar de que puede provocar cambios organolépticos, éstos podrían ser asumibles por el consumidor al contrario que los que se producen a la dosis máxima permitida de 10 kGy.

Para este estudio, se escogieron distintos tipos de alimentos RTE según su composición y tipo de procesado. Así se tuvieron en cuenta los cambios producidos en jamón cocido bajo en grasa en lonchas (fiambres cárnicos sometidos a nitrificación y cocción), hamburguesas elaboradas con mezcla de carne de vacuno y de cerdo con contenido de sal de $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (carne fresca finamente dividida), jamón serrano paleta ibérica en lonchas (producto cárnico madurado), queso blando en lonchas tipo sándwich (producto sometido a un proceso de fermentación) y salmón noruego ahumado en lonchas (producto sometido a un tratamiento térmico de ahumado).

III.2.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Los métodos de hidrólisis y extracción de aminoácidos más habituales implican la utilización de medios fuertemente ácidos (HCl 6 M ó 6 N) o básicos (2-4 N) durante largos periodos de tiempo y a una temperatura comprendida entre 40-100 °C. Este tipo de hidrólisis, aunque resultan eficaces, puede producir la degradación o destrucción de los aminoácidos más lábiles como es el caso del triptófano.

En el presente estudio se evalúa la posibilidad de determinación de tirosina, fenilalanina y triptófano y sus principales productos de degradación, o- y m- tirosina y 5-OH-triptófano, mediante extracción en medio ácido antioxidante en baño de ultrasonidos a temperatura ambiente, evitando racemizaciones, transformaciones de un enantiómero en otro y manteniendo la integridad de los aminoácidos más lábiles como el triptófano.

▪ Estudio de la eficacia de la extracción.

Tal y como se ha comentado anteriormente, las hidrólisis fuertes tanto en medio ácido como básico, pueden provocar la destrucción de algunos aminoácidos. Así pues, partiendo de esta premisa se decidió ensayar varias hidrólisis ácidas utilizando medios ácidos suaves y en condiciones de tiempo y temperatura moderadas. Los ensayos se llevaron a cabo en muestras de jamón cocido, puesto que de entre todos los alimentos escogidos para el estudio, era el que aparentemente presentaba una matriz más compleja (según las especificaciones del fabricante, éste contenía fécula de patata y almidón en su composición). Por otra parte, en estos

estudios únicamente se consideraron los tres aminoácidos escogidos como marcadores, es decir la tirosina, fenilalanina y triptófano.

En primer lugar, se realizaron varias pruebas de hidrólisis en medio HCl (0.1 M, y 3 M) y en un medio ácido más suave como el acético (0.1 M, y 3 M) con distinta duración (30 min, 1 h y 3 h) y a distintas temperaturas (60 °C y 100 °C). Todos los experimentos se han realizado por triplicado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5 de la parte experimental utilizando 2 gramos de jamón cocido y 5 mL de medio ácido y añadiendo $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada uno de los aminoácidos, evaluando la recuperación obtenida en cada caso mediante comparación de las áreas obtenidas en un extracto de jamón cocido sometido al mismo tratamiento y enriquecido con la misma concentración de cada uno de los aminoácidos. Tras la hidrólisis, los extractos se centrifugaron durante 10 min a 4200 rpm de tal manera que el sobrenadante, una vez pasado por un filtro de jeringa de nailon de $0.45 \mu\text{m}$, ajustado el pH a 6 y tras añadir un 6% de metanol, se analizó mediante HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3 de la parte experimental. Los resultados obtenidos en dichos análisis se recogen en la tabla 85. En dicha tabla aparecen sombreados en color gris los resultados correspondientes a la hidrólisis en medio ácido clorhídrico, mientras que las correspondientes a los estudios realizados con ácido acético aparecen sin sombrear.

Tabla 85. Influencia del medio de hidrólisis en la eficacia de extracción de aminoácidos en muestras de jamón cocido.

Condiciones de hidrólisis	Recuperación (%)		
	tirosina	fenilalanina	triptófano
HCl 0.1 M, 100 °C, 3 horas	68 ± 3	65 ± 5	-
HCl 3 M, 100 °C, 3 horas	64 ± 4	57 ± 2	-
AcOH 0.1 M, 100 °C, 3 horas	54 ± 7	55 ± 4	-
AcOH 3 M, 100 °C, 3 horas	66 ± 2	60 ± 3	-
HCl 0.1 M, 100 °C, 1 hora	72 ± 3	75 ± 2	-
HCl 3 M, 100 °C, 1 hora	65 ± 5	70 ± 4	-
AcOH 0.1 M, 100 °C, 1 hora	75 ± 3	68 ± 4	15 ± 4
AcOH 3 M, 100 °C, 1 hora	80 ± 5	70 ± 3	10 ± 4
AcOH 0.1 M, 60 °C, 1 horas	57 ± 6	62 ± 2	5 ± 2

Tal y como se observa en la tabla 85, la utilización de medios ácidos de hidrólisis ya sea en HCl o AcOH proporciona recuperaciones aceptables tanto de la

tirosina como de la fenilalanina. En general, estas recuperaciones son mayores cuando el tiempo de tratamiento es menor, lo que indica que tratamientos prolongados pueden provocar destrucción de parte de estos aminoácidos, en concreto las hidrólisis con ácido clorhídrico produce la destrucción parcial de la tirosina y la conversión de ésta a sus cloroderivados (455). Con respecto al triptófano, únicamente se obtienen recuperaciones modestas (no superiores al 20%) cuando se utilizan medios ácidos suaves, o cuando el tiempo y temperatura de tratamiento no son elevados, lo que indica la destrucción de este aminoácido en la mayoría de las condiciones ensayadas. La determinación de este aminoácido en condiciones ácidas provoca la destrucción del mismo generando amonio y afectando por tanto a la exactitud de la determinación (455).

Estos estudios previos pusieron de manifiesto por tanto la necesidad de utilización de un medio antioxidante para la extracción de los analitos. Tal y como se comentó en la parte de antecedentes, muchos autores como Lang y col (75) o Gil Díaz y col. (77) han optado por la utilización de metodologías de hidrólisis y de extracción de aminoácidos libres en medios tamponados y antioxidantes utilizando agitaciones mecánicas suaves como el vortex o en baño de ultrasonidos, asegurando la extracción eficaz los aminoácidos libres, sin destrucción ni transformación de los mismos. Por tanto en este punto, se decidió emplear una metodología de extracción sólido-líquido, basada en agitación en baño de ultrasonidos (77) y utilizando como medio extractante un medio antioxidante como el ácido ascórbico en concentración 1 mM (75).

Las condiciones óptimas para la extracción de los aminoácidos libres en las muestras de jamón cocido, se han establecido en función de parámetros como la concentración y volumen de ácido ascórbico, tiempo de extracción, temperatura y número de extracciones consecutivas. Todos los experimentos se han realizado por triplicado con 2 gramos de muestra y una cantidad adicionada de $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tirosina, fenilalanina y triptófano. La recuperación obtenida en cada caso se ha evaluado mediante comparación de las áreas obtenidas con las resultantes en el análisis de un extracto obtenido en la extracción de la misma cantidad jamón cocido enriquecido posteriormente con $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada uno de los aminoácidos.

Siguiendo el método propuesto por Gil Díaz y col. (77), los estudios se comenzaron realizando una única etapa de extracción, con un volumen de 5.0 mL de ácido ascórbico 1 mM y un tiempo de agitación en ultrasonidos de 30 min. El extracto se separó del jamón cocido mediante centrifugación a 4200 rpm durante 15 minutos.

Un mililitro del extracto final una vez pasado por un filtro de jeringa de nailon de 0.45 μm se analizó mediante HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3 de la parte experimental. Las recuperaciones obtenidas en estas condiciones estuvieron en torno al 49 % y 54 % de la tirosina y fenilalanina respectivamente y 40 % de triptófano. Dichos resultados parecen estar de acuerdo con los obtenidos por Lang y col (75) quienes sugirieron que el uso del ácido ascórbico, resultaba un medio de extracción idóneo para el análisis de triptófano dado su poder antioxidante.

Con el fin de mejorar las recuperaciones de los tres aminoácidos estudiados, se estudió la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de los herbicidas y el número de extracciones consecutivas. Para ello, se llevaron a cabo varias extracciones consecutivas de 30 min, manteniendo constante el volumen de ácido ascórbico 1 mM en 5 mL según la siguiente sistemática:

- Dos etapas consecutivas de extracción en ultrasonidos de 30 min cada una (t total= 30 min, 3 mL+2 mL).
- Tres etapas consecutivas de extracción en ultrasonidos de 30 min cada una (t total= 90 min, 2 mL+2 mL+1 mL).
- Cuatro etapas consecutivas de extracción en ultrasonidos de 30 min cada una (t total= 90 min, 1.5 mL+1.5 mL+1 mL+1 mL).
- Cuatro etapas consecutivas de extracción en ultrasonidos de 30 min cada una (t total= 120 min, 1.5 mL+1.5 mL+1 mL+1 mL).
- Cinco etapas consecutivas de extracción en ultrasonidos de 30 min cada una (t total= 150 min, 1 mL+1 mL+1 mL+1 mL+1 mL).

Después de cada etapa de extracción los extractos de ácido ascórbico se separaron del residuo de jamón cocido mediante centrifugación a 4200 rpm durante 15 minutos, recogiendo los extractos en un matraz de 5 mL. Un mililitro del extracto final una vez pasado por un filtro de jeringa de nailon de 0.45 μm , ajustado el pH a 6 y tras añadir un 6% de metanol, se analizó mediante HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5 de la parte experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 56.

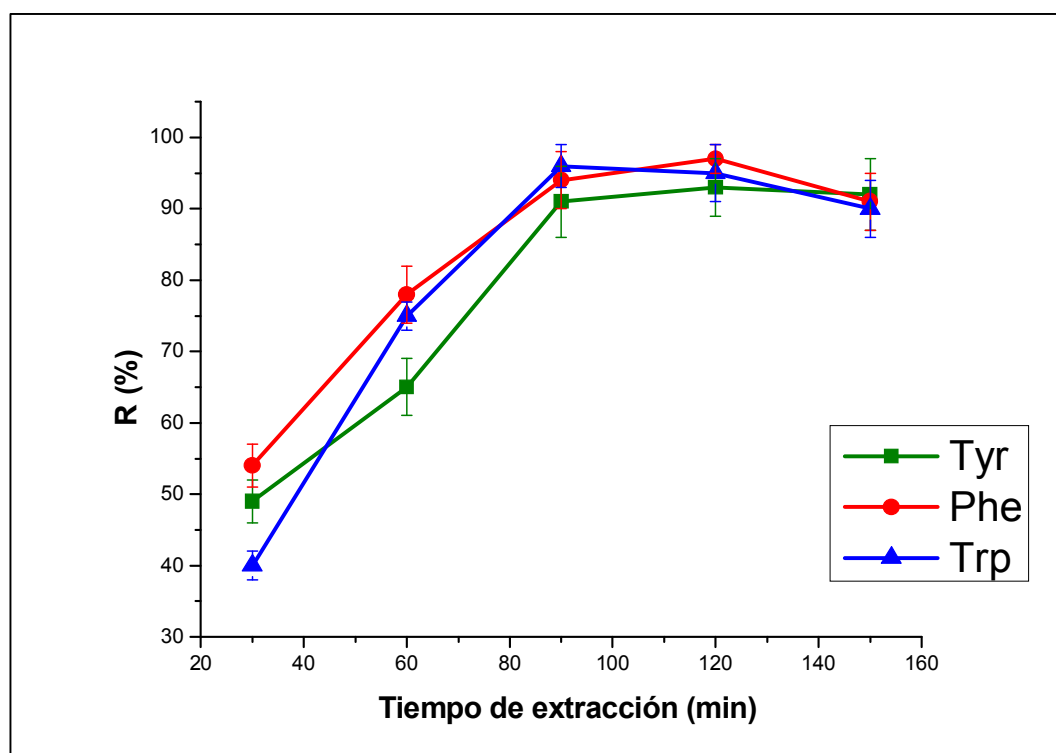


Figura 56. Influencia del tiempo de extracción en la eficacia de extracción de aminoácidos con ultrasonidos.

Como se puede observar en la figura anterior, la extracción de los tres aminoácidos aumentan al aumentar el número de extracciones y por tanto el tiempo de tratamiento. Con un tiempo de extracción de 120 min, las recuperaciones para todos los aminoácidos son similares a las obtenidas con un tiempo de 90 min, excepto para la fenilalanina que aumenta ligeramente, por lo que llegando a un compromiso entre el tiempo de análisis y la recuperación obtenida se ha seleccionado un tratamiento de 3 extracciones consecutivas (90 minutos) como el tiempo óptimo de tratamiento.

Seguidamente se evaluó la concentración de ácido ascórbico empleado en la extracción. Se evaluaron distintas concentraciones comprendidas en el intervalo de 1-20 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 57. Tal y como se aprecia en dicha figura, la concentración de ácido ascórbico parece no tener un efecto significativo en el rendimiento de extracción del triptófano. Sin embargo en el caso de la tirosina y en menor medida en la fenilalanina, un aumento de la concentración del ácido supone una disminución de la recuperación obtenida. Este efecto se debe principalmente al aumento de la anchura del pico cromatográfico correspondiente al ácido ascórbico.

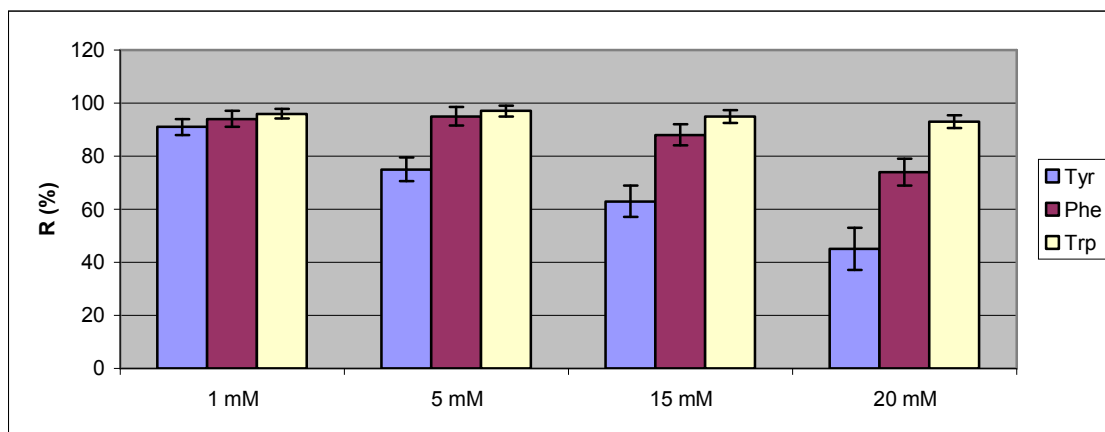


Figura 57. Influencia de la concentración de ácido ascórbico en la eficacia de extracción de aminoácidos con ultrasonidos.

En las condiciones de separación utilizadas en la columna primaria (metanol-acetato amónico 20 mM pH 6 6:94, v/v), el ácido ascórbico presenta un tiempo de retención de 2.5 min. Al aumentar la concentración del mismo, la anchura de pico aumenta tanto, que en concentraciones comprendidas entre 15-20 mM, este pico solapa parcialmente con el de la tirosina e incluso con el de la fenilalanina, de ahí que sus recuperaciones disminuyan. Atendiendo a los resultados obtenidos se decidió utilizar ácido ascórbico 1 mM como medio extractante.

Otro parámetro que se consideró al optimizar el tratamiento de extracción fue la temperatura. El tratamiento de agitación en baño de ultrasonidos durante las 3 extracciones consecutivas suponía un aumento del medio acuoso del interior del dispositivo de unos 10 °C con respecto a la temperatura ambiente (35 °C). El tratamiento a altas temperaturas puede provocar la degradación de los aminoácidos estudiados, por tanto se decidió mantener el medio acuoso interior a una temperatura próxima a 15 °C durante todo el tratamiento.

En relación al volumen de agente extractante, se estudiaron diferentes volúmenes comprendidos entre 5-10 mL. La utilización de volúmenes mayores de 5 mL (7 y 10 mL) no conducía a un aumento considerable en las recuperaciones de cada aminoácido. Así por tanto se escogió finalmente un volumen de 5 mL de ácido ascórbico 1 mM para llevar a cabo las tres extracciones consecutivas (2 mL +2 mL+1 mL).

Con el fin de evaluar la posibilidad de racemización de los aminoácidos durante todo el tratamiento de extracción, se realizaron ensayos similares sobre disoluciones

patrón y no se detectó en ningún caso la presencia de D- aminoácidos debidos al proceso de extracción a los niveles de detección del método de determinación.

Una vez optimizado el método de extracción se comprobó la aplicabilidad del mismo en la extracción de los productos de degradación de los aminoácidos estudiados, *o*- y *m*- tirosina y 5-OH-triptófano. Para ello sobre 2 gramos de jamón cocido se adicionó una cantidad de $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada uno de los productos de degradación extrayendo los aminoácidos según el procedimiento optimizado. La recuperación obtenida se evaluó en cada caso mediante comparación de las áreas obtenidas en un extracto de jamón cocido sometido al mismo proceso de extracción y enriquecido posteriormente con la misma concentración. Debido a la similitud en la polaridad y en las propiedades ácido-base de estos productos de degradación con sus precursores, las recuperaciones obtenidas fueron bastante parecidas a la de la tirosina y triptófano. Los porcentajes de recuperación para la *o*- y *m*- tirosina se encontraron en torno al 88 % y 90 % respectivamente, mientras que en el caso del 5-OH-triptófano fue del 93%.

Finalmente y una vez optimizado todo el proceso de extracción, se procedió al reajuste del mismo atendiendo a las características de cada uno de los alimentos listos para el consumo (RTE) evaluados. En todos los casos la cantidad de muestra empleada fue de 2 gramos excepto para el jamón ibérico, que debido a la gran cantidad de aminoácidos libres generados por el efecto proteolítico del proceso de curado, únicamente fue necesario partir de 1 gramo de muestra.

Por otra parte, antes de la inyección, todos los extractos se sometieron a un filtrado utilizando un filtro de jeringa de nailon de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para eliminar las partículas de mayor tamaño de las muestras y evitar la absorción de los analitos en el filtro (456). En el caso del queso, y debido a su alto contenido en grasa, fue necesario someter a la muestra a dos filtraciones consecutivas con filtros de nailon de $0.45 \mu\text{m}$ y $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro respectivamente.

▪ Estudio del posible efecto matriz

Una vez optimizado el método de extracción de la tirosina fenilalanina y triptófano, así como de sus principales productos de degradación en las muestras de alimentos listos para el consumo (RTE) escogidos, se estudió el posible efecto matriz

que se observa en muchas ocasiones cuando se analizan muestras con matrices complejas en UV-vis.

Para evaluar el efecto matriz, las distintas muestras de alimentos listos para el consumo se enriquecieron con cantidades crecientes y conocidas de cada uno de los analitos ($5.0 - 25 \mu\text{g g}^{-1}$). Las concentraciones iniciales de aquellos aminoácidos inicialmente presentes en cada alimento se calcularon mediante el método de las adiciones estándar y mediante el calibrado externo (tabla 81) en la columna primaria bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.4.1. de la parte experimental.

El efecto matriz se estudió mediante la comparación de las pendientes de las rectas del calibrado externo y del calibrado por adiciones estándar. En primer lugar, se aplicó un test F para comparar las desviaciones estándar de dichas pendientes, revelando la inexistencia de diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 %. En segundo lugar se aplicó un test t para comparar dichas pendientes comprobándose que efectivamente no existía efecto matriz aparente a los niveles de concentración considerados en el estudio, ya que dicho test revelaba la inexistencia de diferencias significativas entre ambas pendientes un nivel de confianza del 95 %, por lo que se decidió aplicar el calibrado externo para la cuantificación de la tirosina, fenilalanina y triptófano así como sus productos de degradación en las muestras de alimentos listos para el consumo.

▪ Estudio de recuperaciones en muestras de alimentos listos para el consumo RTE enriquecidas con los aminoácidos objeto de estudio

Con el fin de evaluar la eficacia y la aplicabilidad de la metodología de extracción propuesta, se llevó a cabo un estudio de recuperaciones, añadiendo distintas cantidades de los analitos estudiados sobre muestras de dos gramos (1 g en el caso del jamón serrano) teniendo en cuenta las cantidades habitualmente presentes de estos aminoácidos encontradas en este tipo de alimentos (77). Por tanto, los niveles de adición escogidos para cada uno de los analitos se evaluaron en el intervalo de $12-62 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($5-25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ referido al extracto líquido) para todos los alimentos estudiados, excepto para el jamón ibérico cuyos intervalos estudiados estaban entre $25-125 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($5-25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ referido al extracto líquido). Las recuperaciones se calcularon por triplicado tras la estabilización en la oscuridad de la muestra durante 30 minutos una vez enriquecidas con los aminoácidos. En el caso de la tirosina, fenilalanina y triptófano, las recuperaciones se calcularon teniendo en cuenta las

cantidades iniciales de dichos analitos presentes en las muestras. En los productos de degradación no presentes en la muestra inicialmente, las recuperaciones se calcularon por comparación de las áreas de un extracto del alimento correspondiente enriquecido con la misma cantidad. En la tabla 86 se muestran los resultados obtenidos en dicho estudio de recuperaciones.

Tabla 86. Resultados de los estudios de recuperación de la tirosina, fenilalanina y triptófano y sus principales productos de degradación en muestras de alimentos listos para el consumo

Alimento RTE	Añadido ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recuperación (%) (media \pm RSD)					
		Tyr	o-Tyr	m-Tyr	Phe	5-OH-Trp	Trp
Jamón cocido	12	79 \pm 5	82 \pm 4	65 \pm 7	85 \pm 3	91 \pm 2	93 \pm 1
	25	83 \pm 2	90 \pm 2	74 \pm 3	88 \pm 2	96 \pm 3	97 \pm 2
	62	91 \pm 1	93 \pm 3	80 \pm 1	91 \pm 2	98 \pm 1	97 \pm 2
Carne picada en hamburguesas	12	82 \pm 2	66 \pm 3	68 \pm 1	85 \pm 2	87 \pm 4	86 \pm 3
	25	87 \pm 2	71 \pm 4	71 \pm 5	87 \pm 2	94 \pm 5	98 \pm 1
	62	91 \pm 1	75 \pm 3	80 \pm 6	90 \pm 1	93 \pm 2	96 \pm 1
Jamón ibérico	25	86 \pm 2	81 \pm 6	65 \pm 5	83 \pm 4	93 \pm 4	93 \pm 2
	50	87 \pm 1	87 \pm 2	77 \pm 2	91 \pm 1	95 \pm 2	94 \pm 2
	125	87 \pm 2	92 \pm 5	80 \pm 3	92 \pm 2	97 \pm 2	96 \pm 1
Salmón ahumado	12	79 \pm 3	75 \pm 4	66 \pm 2	84 \pm 4	90 \pm 2	94 \pm 2
	25	88 \pm 2	77 \pm 6	67 \pm 5	91 \pm 3	96 \pm 4	95 \pm 1
	62	96 \pm 1	80 \pm 3	70 \pm 3	92 \pm 3	95 \pm 3	96 \pm 1
Queso en lonchas	12	79 \pm 4	80 \pm 2	75 \pm 5	80 \pm 5	90 \pm 2	94 \pm 1
	25	88 \pm 2	87 \pm 4	77 \pm 4	89 \pm 1	95 \pm 2	92 \pm 1
	62	93 \pm 1	93 \pm 4	90 \pm 4	94 \pm 2	96 \pm 1	95 \pm 1

Como se aprecia en la tabla 86, las recuperaciones obtenidas están comprendidas en el intervalo 65-98 %, han sido aceptables para todos los analitos en los tres niveles evaluados, observándose que las mayores recuperaciones en general se han obtenido al nivel más alto de adición. Las RSD obtenidas se encuentran entre 1-7 % para todos los niveles estudiados, demostrando la eficacia del procedimiento de extracción desarrollado en matrices complejas de alimentos, sin necesidad de un tratamiento de limpieza posterior. Por otra parte el método propuesto minimiza las pérdidas de aminoácidos, siendo además más sencillo y rápido que los tratamientos convencionales de hidrólisis.

III.2.3.2. EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES TRANSFORMACIONES QUIRALES DE LA TIROSINA, FENILALANINA Y TRIPTÓFANO EN ALIMENTOS, ASÍ COMO DE LA FORMACIÓN DE SUS PRINCIPALES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO (RTE) TRATADOS CON RADIACIONES IONIZANTES

Tal y como se expuso en el apartado de antecedentes, el tratamiento con radiaciones ionizantes en alimentos listos para el consumo (RTE) puede provocar transformaciones en los aminoácidos presentes en los mismos. Estas modificaciones pueden comprender tanto la conversión del L-aminoácido al D- en mayor o menor medida dependiendo de la dosis del tratamiento, destrucción de aminoácidos o transformación de los mismos en sus principales productos de degradación.

Sin embargo, la información sobre estas transformaciones y de en que medida se producen durante este tratamiento higienizante es aún escasa. Por tanto, el acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral optimizado, así como la metodología de extracción propuesta, se aplicaron tanto en el análisis de la tirosina, fenilalanina y triptófano y sus productos de degradación (o-tirosina, m-tirosina y 5-OH-triptófano), como en la determinación de la presencia de D-enantiómeros de los aminoácidos objeto de estudio en los alimentos RTE escogidos, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5 de la parte experimental.

▪ Estudio de las transformaciones aquirales de los aminoácidos en alimentos irradiados

En primer lugar, mediante la separación en la columna primaria, se determinó el contenido de cada uno de los aminoácidos estudiados así como de sus productos de degradación, analizando un total de 5 réplicas (n=5) tanto en las muestras no irradiadas como en las irradiadas a todas las dosis estudiadas, bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.4.1. de la parte experimental. Los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 87.

Tabla 87. Resultado del análisis de del contenido de tirosina, fenilalanina y triptófano y sus productos de degradación en los RTE estudiados

RTE	Dosis de radiación (kGy)	Tyr* (mg/100 g)	Phe* (mg/100 g)	Trp* (mg/100 g)	o-Tyr* (mg/100 g)	m-Tyr* (mg/100 g)	5-OH-Trp* (mg/100 g)
Jamón cocido	0	1.0 ± 0.3	3.8 ± 0.2	0.66 ± 0.01	0.70 ± 0.02	nd	nd
	1	1.7 ± 0.2	5.2 ± 0.5	0.69 ± 0.01	0.75 ± 0.02	nd	nd
	2	1.2 ± 0.2	3.5 ± 0.3	0.64 ± 0.02	0.95 ± 0.03	nd	nd
	4	0.67 ± 0.09	3.4 ± 0.1	0.52 ± 0.02	0.92 ± 0.03	nd	nd
	6	0.68 ± 0.07	4.0 ± 0.3	0.56 ± 0.03	0.96 ± 0.02	nd	nd
	8	0.8 ± 0.1	4.1 ± 0.3	0.55 ± 0.05	0.80 ± 0.04	nd	nd
Hamburguesas	0	0.52 ± 0.06	6.2 ± 0.4	1.14 ± 0.01	nd	nd	nd
	1	0.54 ± 0.09	6.4 ± 0.2	1.08 ± 0.08	nd	nd	nd
	2	0.61 ± 0.08	6.2 ± 0.5	1.11 ± 0.09	nd	nd	nd
	4	0.8 ± 0.2	6.7 ± 0.7	1.21 ± 0.03	nd	nd	nd
	6	0.4 ± 0.1	4.8 ± 0.4	0.91 ± 0.09	nd	nd	nd
	8	0.16 ± 0.06	5.3 ± 0.3	0.45 ± 0.09	nd	nd	nd
Jamón serrano ibérico	0	94 ± 8	127 ± 7	28 ± 2	nd	nd	nd
	1	93 ± 5	139 ± 18	29 ± 2	nd	nd	nd
	2	95 ± 6	130 ± 10	28 ± 2	nd	nd	nd
	4	117 ± 7	136 ± 6	35 ± 1	nd	nd	nd
	6	147 ± 4	159 ± 8	41 ± 2	nd	nd	nd
	8	102 ± 5	101 ± 9	27 ± 3	nd	nd	nd
Salmón ahumado	0	95 ± 5	86 ± 2	3.18 ± 0.04	nd	nd	nd
	1	88 ± 8	86 ± 3	3.05 ± 0.05	nd	nd	nd
	2	75 ± 3	84 ± 4	3.0 ± 0.1	nd	nd	nd
	4	72 ± 3	78 ± 3	3.0 ± 0.1	nd	nd	nd
	6	83 ± 5	83 ± 8	2.7 ± 0.1	nd	nd	nd
	8	91 ± 9	104 ± 14	3.4 ± 0.2	nd	nd	nd
Queso en lonchas	0	12 ± 1	57 ± 1	2.5 ± 0.1	6.0 ± 0.1	9.6 ± 0.1	nd
	1	11.4 ± 0.6	49 ± 1	1.65 ± 0.05	0.90 ± 0.03	4.5 ± 0.2	0.28 ± 0.01
	2	10.7 ± 0.3	46 ± 1	1.55 ± 0.02	0.50 ± 0.03	4.4 ± 0.1	0.40 ± 0.01
	4	12.9 ± 0.4	68 ± 3	2.07 ± 0.07	0.21 ± 0.02	4.4 ± 0.1	0.42 ± 0.01
	6	20.2 ± 0.6	80 ± 4	2.5 ± 0.1	0.27 ± 0.01	6.2 ± 0.2	0.43 ± 0.04
	8	18.4 ± 0.2	91 ± 2	2.93 ± 0.07	0.43 ± 0.02	9.0 ± 0.2	0.32 ± 0.03

Intervalo de confianza calculado al 95 % de probabilidad, n=5

En los resultados mostrados en dicha tabla se puede observar que el salmón ahumado, el queso en lonchas y el jamón serrano ibérico son los alimentos de mayor contenido en aminoácidos libres, debido a la acción proteolítica y por tanto el incremento de aminoácidos libres que causan los procesos de fermentación, curado y ahumado (66-69,80-84).

Por otra parte, se pudo comprobar que la radiación efectivamente producía cambios en el contenido de aminoácidos en cada uno de los RTE escogidos. Con el fin de detectar posibles diferencias significativas en el contenido de aminoácidos de una dosis de radiación a otra en cada uno de los alimentos estudiados se aplicó el test de análisis de la varianza ANOVA de un factor. En la tabla 88 se muestran los valores de probabilidad P y el estadístico F obtenidos en dicho análisis. Tal y como se observa en dicha tabla, en todos los casos los valores-P fueron menores de 0.05 lo que indica diferencias significativas en el contenido de aminoácidos entre un nivel de radiación y otro. Mediante el test de rango múltiple se pudo comprobar entonces la dosis de radiación a partir del cual empezaban a aparecer tales diferencias significativas (tabla 89).

Con respecto al jamón cocido y el jamón serrano ibérico las diferencias significativas en el contenido de Tyr y Trp se observan a una dosis de radiación de 4 kGy y en el caso de la Phe en el jamón serrano ibérico a partir de una dosis de 6 kGy. En el caso de las hamburguesas las diferencias significativas en el contenido de todos los aminoácidos son evidentes a partir de una radiación de 4 kGy.

Por otra parte en el caso del queso en lonchas, todos los niveles de radiación estudiados mostraron diferencias significativas en el caso de de la Phe y el Trp, y únicamente en la Tyr estas diferencias aparecieron a partir de una dosis de radiación de 2 kGy.

Por último en el salmón ahumado el contenido en Tyr y Trp se modificó a partir de un nivel de 2 kGy y 4 kGy respectivamente y los niveles de Phe únicamente se modificaron a la dosis de radiación estudiada más alta (8 kGy).

La variación del contenido de tirosina, fenilalanina y triptófano se visualiza fácilmente en los gráficos de medias para cada uno de los alimentos RTE objeto de estudio mostrado en la figura 58.

Tabla 88. Resultado del test ANOVA para los datos de composición aminoacídica obtenidos en cada uno de los alimentos RTE estudiados

RTE	Tyr		Phe		Trp		o-Tyr		m-Tyr		5-OH-Trp	
	Relación de varianzas	valor - P	Relación de varianzas	valor - P	Relación de varianzas	valor - P	Relación de varianzas	valor - P	Relación de varianzas	valor - P	Relación de varianzas	valor - P
Jamón cocido	12.47	0.0002	12.29	0.0003	20.58	0.0001	35.98	0.0001	-	-	-	-
Hamburguesas	14.18	0.0001	9.04	0.0009	39.68	0.0001	-	-	-	-	-	-
Jamón serrano ibérico	51.80	0.0001	15.23	0.0001	39.50	0.0001	-	-	-	-	-	-
Salmón ahumado	8.35	0.0001	6.90	0.0004	12.42	0.0001	-	-	-	-	-	-
Queso en lonchas	369.15	0.0001	280.90	0.0001	170.70	0.0001	5367	0.0001	915.23	0.0001	214.95	0.0001

Tabla 89. Resultado del test de rango múltiple para los datos de composición aminoacídica obtenidos en cada uno de los alimentos RTE estudiados

Comparación entre dosis (kGy)	Jamón cocido			Hamburguesas			Jamón serrano ibérico			Salmón ahumado			Queso en lonchas		
	Tyr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Trp
0-1															
0-2															
0-4															
0-6															
0-8															
1-2															
1-4															
1-6															
1-8															
2-4															
2-6															
2-8															
4-6															
4-8															
6-8															

Los espacios coloreados indican diferencias significativas entre los niveles de radiación comparados.

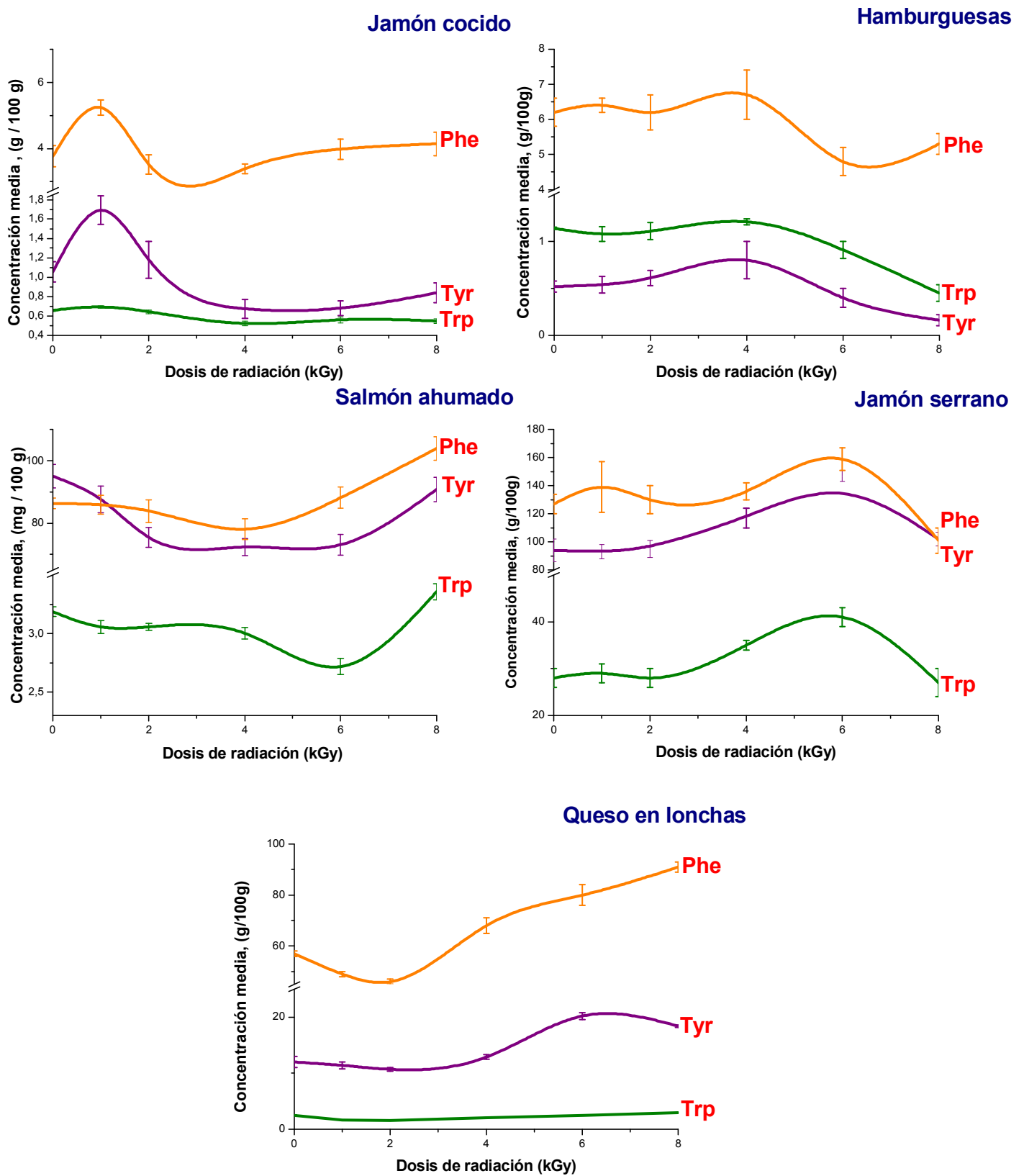


Figura 58. Gráficos de medias del contenido de aminoácidos en los distintos RTE estudiados y a los diferentes niveles de radiación

Con respecto a los productos de degradación de los aminoácidos estudiados, únicamente se detectaron pequeñas cantidades de *o*-Tyr en jamón cocido, mientras que en el queso en lonchas se encontraron tanto los productos de degradación de la Tyr, *o*- y *m*- Tyr, como el derivado hidroxilado del triptófano 5-OH-Trp. En el caso del jamón cocido las diferencias significativas en el contenido de *o*-Tyr aparecen a radiaciones por encima de 1 kGy, mientras que en el queso en lonchas las diferencias significativas en el contenido de *o*- y *m*- Tyr y 5-OH-Trp son notables en cualquier dosis de radiación aplicada. Los resultados obtenidos parecen estar de acuerdo con los recogidos por otros autores (130, 457), quienes sugieren que en carnes irradiadas, pollo y pescados, la descarboxilación de algunos aminoácidos como la tirosina o el triptófano puede producir aminas biogénicas las cuales sirven como indicador de la toxicidad del alimento. Este hecho puede ser la razón del pronunciado descenso del contenido de la tirosina y triptófano en el salmón ahumado. A pesar de que algunos autores (127-128, 458) sugieren el descenso de los niveles de Phe y Trp y el aumento de los de Tyr a la formación de los productos de degradación de la tirosina y el triptófano, este efecto únicamente se observó en el caso del jamón cocido y del queso en lonchas.

Comparando los resultados obtenidos con aquellos recogidos por Lacroix y col. (459), se puede concluir que atendiendo a los cambios producidos en el contenido de aminoácidos el tratamiento con radiaciones ionizantes hasta dosis de 8 kGy no supone ningún problema nutricional y las pérdidas de aminoácidos pueden ser comparables a las obtenidas en cualquier tratamiento de cocinado.

▪ Estudio de las transformaciones quirales de los aminoácidos en alimentos irradiados

Como paso previo al análisis de las posibles transformaciones quirales en los aminoácidos de los alimentos RTE, se efectuaron varios ensayos con disoluciones patrón de tirosina, fenilalanina y triptófano que habían sido tratadas con radiaciones ionizantes, con el fin de comprobar el efecto de dicho tratamiento en la formación de D-aminoácidos. Para ello, disoluciones patrón preparadas según el procedimiento 3.5.1. de la parte experimental se sometieron a tratamiento con radiaciones ionizantes en dosis comprendidas entre 1-8 kGy. Dichas disoluciones de patrones irradiados se analizaron bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.3. de la parte experimental

Las cantidades de D-aminoácido encontradas en cada uno de los ensayos efectuados y expresadas como exceso enantiomérico referido al enantiómero L- (Ec.. [18]) se muestran en la tabla 90. En la figura 59, a modo de ejemplo se recogen algunos de los cromatogramas de dicho estudio.

Tabla 90. Resultado del análisis de patrones de aminoácidos irradiados a dosis comprendidas entre 1-8 kGy.

Dosis de radiación (kGy)	Tyr	Phe	Trp
	e.e. (%)	e.e. (%)	e.e. (%)
1	100	100	100
2	100	100	100
4	100	100	100
6	38	25	100
8	10	4	100

A la vista de los resultados mostrados tanto en la tabla anterior como en la figura 59, se puede comprobar que el tratamiento de patrones de aminoácidos libres con radiaciones ionizantes provoca racemización en cierta extensión sobretudo a las dosis más altas estudiadas, salvo en el caso del triptófano, que mantiene la configuración L- en todas las dosis ensayadas. Sin embargo en la tirosina y la fenilalanina, la transformación de L-aminoácido al D- empieza a ser notable a partir de una dosis de radiación de 6 kGy, llegando a ser casi total en la dosis de 8 kGy.

La retención de la configuración L- por parte del triptófano, podría ser debida a la presencia del anillo indol en su estructura. El impedimento estérico creado por dicho grupo podría dificultar el paso de la forma L- del aminoácido a la D-, mientras que en el caso de la tirosina y fenilalanina y debido a la ausencia de este grupo, la transformación de un enantiómero en otro se ve más favorecida.

Así pues, los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares pusieron de manifiesto la posibilidad de racemización de los aminoácidos libres cuando estos son sometidos a tratamiento mediante electrones acelerados a dosis elevadas.

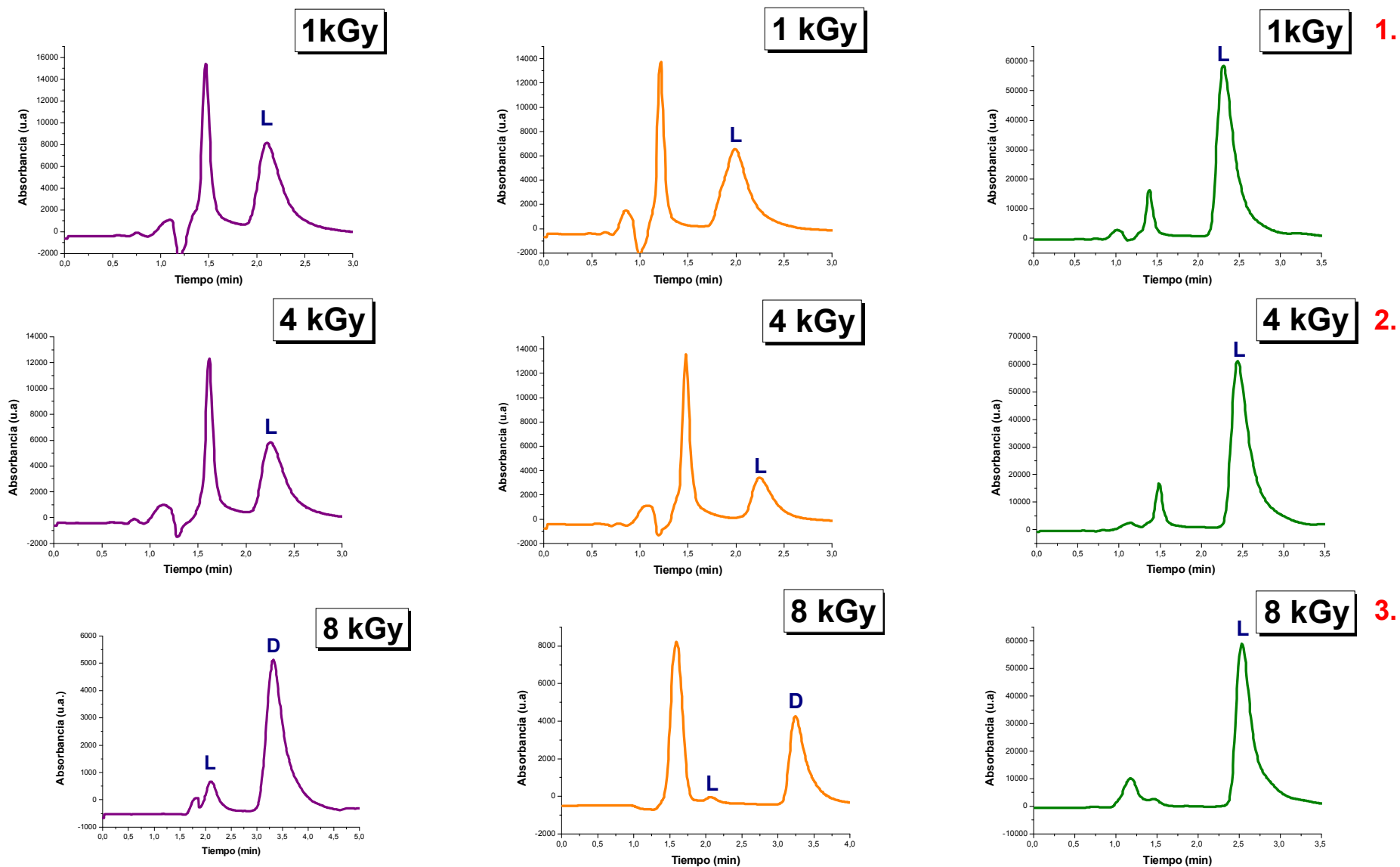
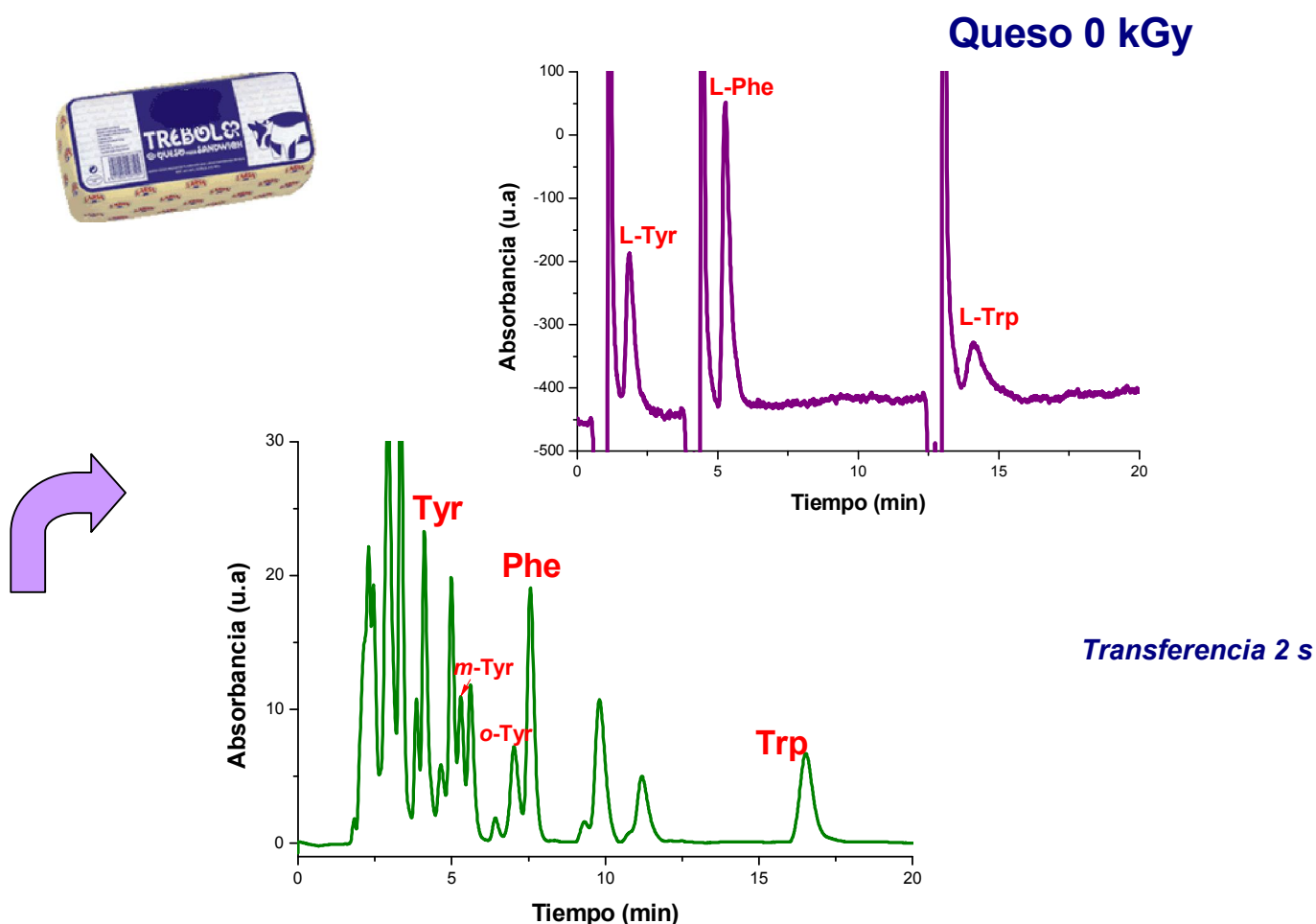


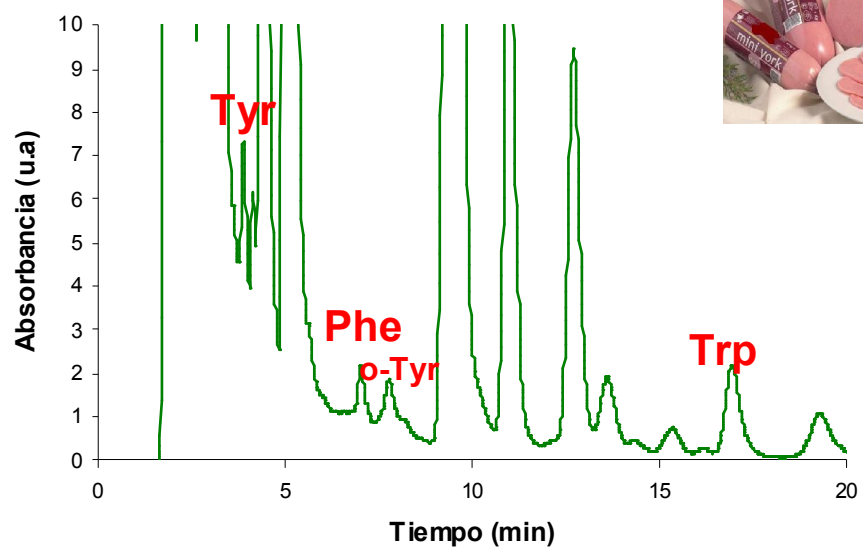
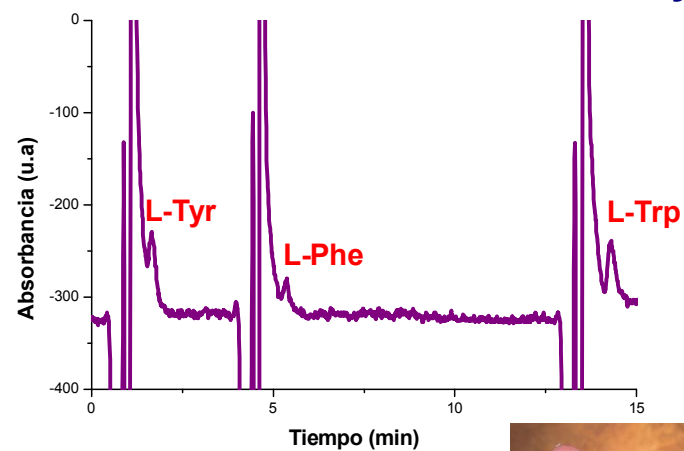
Figura 59. Cromatogramas obtenidos en el estudio de patrones de aminoácidos irradiados: 1. tirosina, 2. fenilalanina y 3. triptófano

Una vez evaluado el efecto de la radiación en patrones, el uso de la segunda dimensión del acoplamiento cromatográfico con la columna quiral de teicoplanina permitió evaluar la posible racemización de los aminoácidos libres de los alimentos RTE seleccionados en el estudio. Para ello, los picos cromatográficos de los aminoácidos libres en cada alimento se fueron transfiriendo a la columna quiral mediante la válvula de desplazamiento y se analizaron bajo las condiciones especificadas en el apartado 3.3. de la parte experimental.

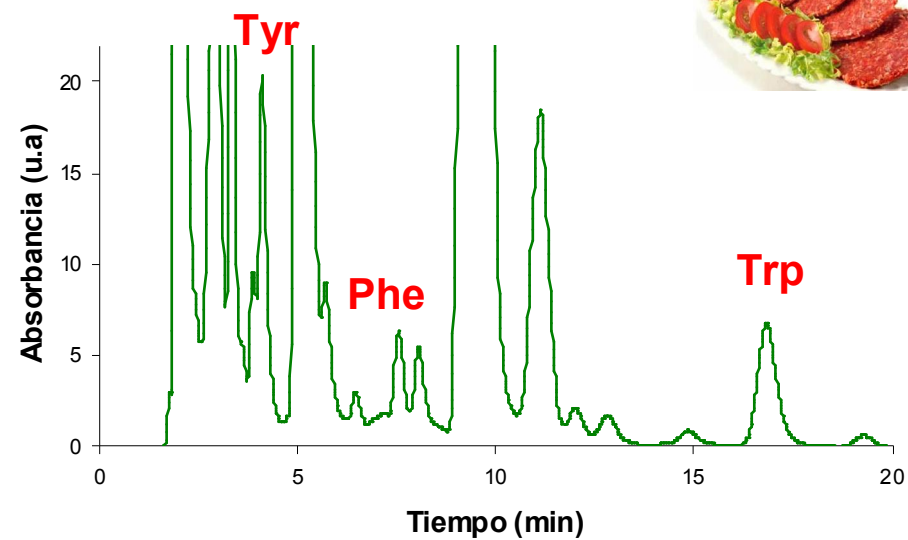
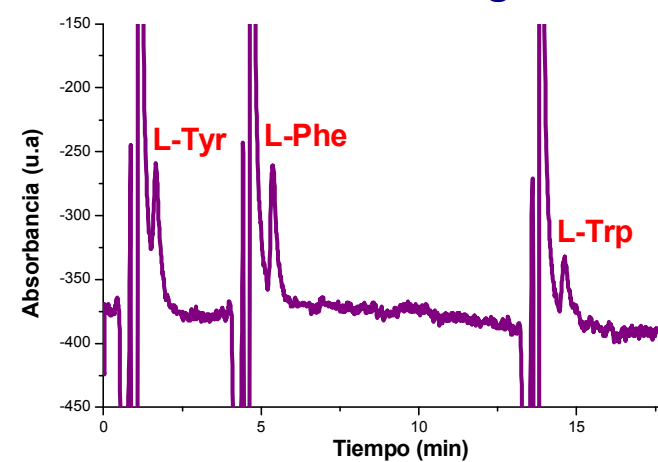
A pesar que en el estudio de patrones irradiados se detectó la formación de D-aminoácidos en pequeñas cantidades en las dosis de radiación más altas, en ninguno de los alimentos estudiados y a ninguna de las radiaciones aplicadas, no se detectó la presencia de D-aminoácidos a los niveles de detección del método propuesto. Resultados que parecen estar de acuerdo con aquellos obtenidos por Gil y col (77) en el estudio de la racemización de aminoácidos en jamón cocido irradiado, concluyendo por tanto que el tratamiento con radiaciones ionizantes en dosis comprendidas entre 1-8 kGy no produce racemizaciones significativas a los niveles de detección del método propuesto. En la figura 60 a modo de ejemplo, se recogen algunos cromatogramas representativos obtenidos en este estudio.



Jamón cocido 1 kGy



Hamburguesas 2kGy



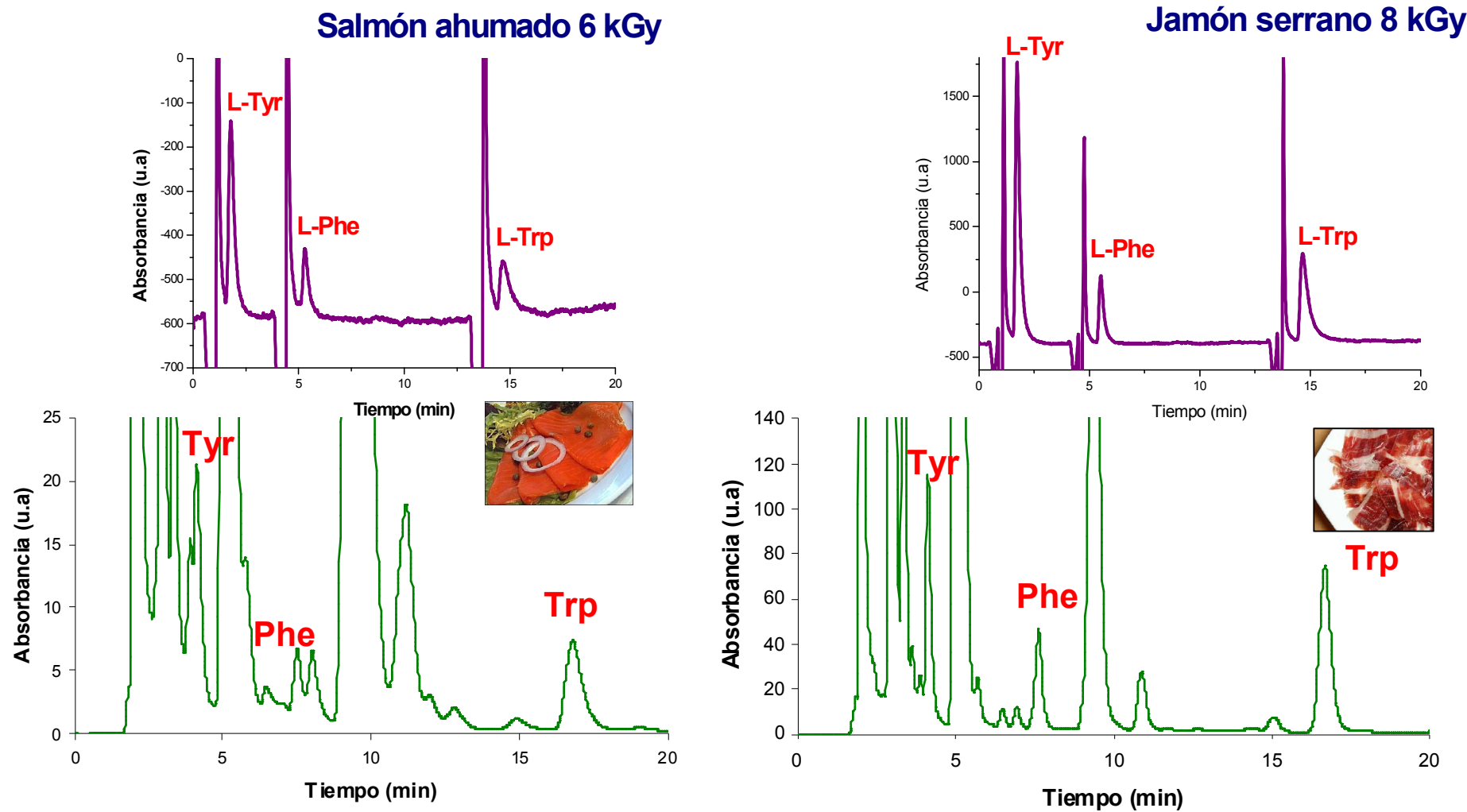


Figura 60. Cromatogramas obtenidos mediante el acoplamiento cromatográfico optimizado en el análisis de los distintos RTE estudiados

Los resultados obtenidos muestran que el efecto de la radiación ionizante en patrones de aminoácidos y sobre los aminoácidos libres en los alimentos estudiados es totalmente distinto. Mientras que en el caso de los patrones se observaron cantidades significativas de D-Tyr y D-Phe cuando la dosis de radiación aplicada estaba comprendida entre 6-8 kGy, en el estudio de los alimentos listos para el consumo (RTE) no se detectó la presencia de D-aminoácidos a los niveles de detección del método propuesto a ninguna de las dosis de radiación ensayadas. Dichos estudios ponen de evidencia la influencia de composición del alimento en el efecto de la radiación. Algunos autores como Wong y col. (460) sugieren que algunos componentes de los alimentos como la grasa o la vitamina C pueden actuar como agentes protectores, mitigando el efecto de la irradiación tanto en la eliminación de microorganismos patógenos como en la alteración de las características físico-químicas del alimento.

El uso del acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral propuesto ha permitido la determinación tanto de los productos de degradación de los aminoácidos escogidos como marcadores (tirosina, fenilalanina y triptófano) como la confirmación de la no presencia de D-aminoácidos producidos por racemización en varios tipos de alimentos listos para el consumo sometidos a radiaciones ionizantes. Al igual que en caso del acoplamiento aplicado al análisis de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos el uso de este tipo de acoplamientos en el análisis de muestras complejas proporciona cromatogramas más limpios y sensibilidad suficiente evitando posibles etapas previas de limpieza de la muestra y preservando la integridad de la columna, garantizando así el buen funcionamiento de la misma durante un número elevado de análisis. Además del efecto de limpieza en línea adicional que proporciona, el acoplamiento HPLC aquiral- HPLC quiral, el método es práctico y fácil de llevar a cabo y permite determinaciones precisas tanto quirales como no quirales en muestras complejas.

III.2.4. EVALUACIÓN MEDIANTE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO

Tal y como quedó reflejado en los estudios anteriores, el efecto de la radiación ionizante en patrones de aminoácidos y sobre los aminoácidos libres en los alimentos estudiados, es totalmente distinto. Mientras que en el caso de los patrones se

observaron cantidades significativas de D-aminoácidos a las dosis de radiación más elevadas, en el estudio de los alimentos listos para el consumo (RTE) no se detectó la presencia de D-aminoácidos a los niveles de detección del método propuesto a ninguna de las dosis de radiación ensayadas.

Por el contrario el efecto de la radiación ionizante resultó evidente en la composición aminoacídica, la cual, se modificó en mayor o menor medida según el tipo de alimento y la dosis de radiación aplicada. Ante estas evidencias de que este tratamiento higienizante produce ciertas modificaciones en algunos alimentos y para algunas dosis, se decidió evaluar los posibles efectos de la radiación ionizante sobre algunos componentes de interés tanto mayoritarios como minoritarios de los alimentos RTE. Para este estudio se consideró el contenido de proteína, grasa, humedad, nitratos y nitritos así como el contenido de aminoácidos libres y sus principales productos de degradación presentes en las muestras irradiadas.

Mediante herramientas quimiométricas, tales como el análisis de componentes principales (PCA), análisis de la varianza (ANOVA), test de rango múltiple (MRT) y regresión lineal múltiple (MLR), se intentó establecer modelos que permitan predecir las alteraciones que se producen en los alimentos tratados con radiaciones según la dosis aplicada, identificar las causas de los cambios observados y por tanto establecer una relación entre ellos. Para ello se analizaron un total de 240 muestras al menos por triplicado y los datos experimentales se procesaron utilizando el software estadístico de tratamiento de datos **STATGRAPHICS CENTURION XV versión 15.2.11**.

II.2.4.1. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS COMPOSICIONALES EVALUADOS

Como se puso de manifiesto en los antecedentes, algunos autores (79) sostienen que el tratamiento con radiaciones ionizantes puede afectar tanto a los componentes mayoritarios como minoritarios de los alimentos, así como a los aditivos incorporados durante las operaciones de procesado de los mismos. Así pues en este estudio se decidió incluir aquellos parámetros composicionales cuya modificación estuviese relacionada con el cambio en las propiedades sensoriales del alimento, o conllevarse la formación de productos secundarios potencialmente tóxicos.

Por tanto como componentes mayoritarios de los alimentos susceptibles a la modificación durante el proceso de irradiación se incluyeron la humedad, el contenido en grasa y el de proteína. Como se expuso en los antecedentes, la incidencia de la radiación ionizante en las moléculas de agua, genera radicales libres altamente reactivos que aceleran la oxidación lipídica (111). Así mismo, la radiación puede inducir tanto la formación de nuevos aminoácidos libres provenientes de la radiolisis de proteínas (130) o, como quedó demostrado en los resultados recogidos en el apartado III.2.3.2. de esta sección, la destrucción de los ya existentes y formación de sus principales productos de degradación. (126-128).

En el caso de alimentos de alto contenido proteico, durante el proceso de radiación y procesado de los mismos, los aminoácidos libres pueden reaccionar entre si dando lugar a la formación de aminas aromáticas heterocíclicas o algunas γ -carbolinas altamente tóxicas y potencialmente carcinogénicas (134).

Algunos aditivos alimentarios como los nitratos y nitritos han sido empleados tradicionalmente como conservantes en carnes curadas (461) o en el ahumado de pescados (132). Por esta razón, se decidió incluirlos en el estudio debido a que los niveles de nitrito también se pueden ver modificados durante la irradiación, debido a su facilidad de reacción con aminoácidos libres y aminas secundarias para generar nitrosaminas, compuestos que por otra parte, son altamente tóxicos debido a sus efectos carcinogénicos (133).

III.2.4.2. ANÁLISIS COMPOSICIONAL

Los parámetros composicionales escogidos en el estudio se determinaron siguiendo los métodos de referencia o validados descritos en el apartado 3.5 de la parte experimental, tanto en muestras irradiadas como no irradiadas y a todos los niveles de radiación.

Así, el contenido proteico se determinó por cuadruplicado ($n=4$) a cada nivel de radiación y en cada muestra, introduciendo ligeras modificaciones al método oficial AOAC 981.10 (431), basado en la determinación del Nitrógeno proteico del alimento mediante el método Kjeldah. En el caso del contenido de grasa, la determinación gravimétrica se llevó por triplicado ($n=3$) previa extracción de la misma mediante extracción acelerada con disolventes siguiendo las notas de aplicación recomendadas

para cada alimento por la propia casa comercial (433-433). Dicha técnica proporciona rendimientos similares a la extracción mediante el método convencional de extracción por Soxhlet, con un menor consumo de disolventes y tiempos de análisis más cortos. La determinación de la humedad se llevó a cabo por triplicado también (n=3), mediante el método oficial AOAC 930.15 (434), basado en una gravimetría tradicional previo secado de la muestra a 135 °C durante dos horas. En cuanto al contenido de nitratos y nitritos, el análisis (n=3) se realizó mediante el método de referencia ISO 14673-1 (435) basado en la determinación espectrofotométrica del complejo coloreado formado en la reacción de Greiss. Por último el contenido de los aminoácidos libres escogidos como marcadores en el estudio (tirosina, fenilalanina y triptófano, así como sus principales productos de degradación (*o*- y *m*- tirosina y 5-OH-triptófano) se determinó por quintuplicado (n=5) mediante las condiciones descritas en el apartado 3.4.1. de la parte experimental. Los resultados obtenidos en el análisis de los componentes composicionales escogidos para el estudio se muestran en la tabla 91.

Como puede apreciarse el jamón cocido, jamón serrano ibérico y salmón ahumado presentaron nitratos en su composición, mientras que únicamente se detectó la presencia de nitritos en las dos variedades de jamón estudiadas. El descenso de la concentración de nitritos parece ser dependiente de la dosis de radiación aplicada, ya que en el caso del jamón cocido la concentración de nitritos se reduce casi en la tercera parte del contenido inicial a medida que la radiación es más intensa, mientras que en el jamón serrano la radiación hace desaparecer el contenido inicial de nitritos en el mismo. Estos resultados parecen estar de acuerdo con los anteriormente recogidos por otros autores (102), quienes sugieren que la irradiación provoca una disminución del contenido de nitritos en carnes curadas y de ave. Además, se observó el mismo patrón de modificación del contenido de nitratos en el jamón cocido, donde un aumento de la intensidad de la radiación, implicaba una disminución del contenido de los mismos.

Con respecto al contenido de proteína, a pesar del ligero descenso observado en el caso del jamón cocido debido posiblemente a la existencia de radiolisis de proteínas, es uno de los parámetros menos modificado por la radiación en todos los alimentos estudiados. Tanto en las muestras irradiadas como no irradiadas, el contenido en agua fue similar para todos los RTE seleccionados., sin embargo el contenido en grasas únicamente se mantuvo similar en el caso de las hamburguesas y el queso en lonchas, observándose una disminución importante (de casi el 50 %) en el

salmón ahumado, y en las dos variedades de jamón a medida que la dosis de radiación se intensificaba.

Tabla 91. Resultados obtenidos en el análisis composicional obtenidos en cada uno de los alimentos RTE estudiados

RTE	Dosis (kGy)	Humedad^a (%)	Proteína^b (%)	Grasa^a (%)	Nitritos^a (mg Kg⁻¹)	Nitratos^a (mg Kg⁻¹)
Jamón cocido	0	31 ± 2	19 ± 1	2.67 ± 0.08	12 ± 2	48 ± 5
	1	32.4 ± 0.7	17 ± 2	2.67 ± 0.08	8 ± 2	64 ± 7
	2	28.1 ± 0.5	15 ± 1	2.6 ± 0.2	3.9 ± 0.6	38 ± 1
	4	28.1 ± 0.5	14.2 ± 0.9	2.4 ± 0.2	3.4 ± 0.1	23 ± 2
	6	31 ± 2	15 ± 1	2.0 ± 0.3	5.3 ± 0.6	42 ± 2
	8	29 ± 2	14 ± 1	1.1 ± 0.2	4.9 ± 0.2	24.8 ± 0.8
Hamburguesas	0	32 ± 2	36 ± 1	8 ± 1	nd	nd
	1	32.8 ± 0.9	34.3 ± 0.8	7 ± 1	nd	nd
	2	32 ± 4	36 ± 2	7 ± 2	nd	nd
	4	34 ± 2	35 ± 3	5.8 ± 0.6	nd	nd
	6	33.1 ± 0.3	35 ± 4	7 ± 1	nd	nd
	8	31 ± 4	35 ± 4	7 ± 1	nd	nd
Jamón serrano ibérico	0	70 ± 5	32 ± 3	20.5 ± 0.9	2.7 ± 0.8	64 ± 5
	1	66 ± 4	31 ± 4	22 ± 1	nd	85 ± 2
	2	67 ± 4	32 ± 2	20.3 ± 0.8	nd	70 ± 5
	4	70 ± 1	27 ± 3	22 ± 1	nd	61 ± 4
	6	65 ± 4	28 ± 3	15.4 ± 0.6	nd	94 ± 3
	8	68 ± 4	28 ± 2	15 ± 1	nd	92 ± 4
Salmón ahumado	0	35.2 ± 0.4	34 ± 5	4.8 ± 0.2	nd	12 ± 2
	1	39.4 ± 0.4	35 ± 1	4.4 ± 0.8	nd	17 ± 1
	2	39 ± 3	36 ± 3	4.1 ± 0.1	nd	17 ± 2
	4	38 ± 3	33 ± 5	3.3 ± 0.3	nd	nd
	6	39.5 ± 0.9	33.7 ± 0.7	2.8 ± 0.3	nd	nd
	8	39.5 ± 0.9	32 ± 2	2.8 ± 0.3	nd	nd
Queso en lonchas	0	59.2 ± 0.6	31 ± 3	25 ± 2	nd	nd
	1	59.2 ± 0.6	31 ± 3	27 ± 1	nd	nd
	2	59.6 ± 1.5	30.1 ± 0.9	28.6 ± 0.2	nd	nd
	4	58.7 ± 0.5	30.1 ± 0.9	21 ± 4	nd	nd
	6	61.2 ± 0.9	30 ± 3	29 ± 3	nd	nd
	8	59.0 ± 0.3	28 ± 2	27 ± 3	nd	nd

nd: no detectado

Valores medios expresados con el límite de confianza al 95 %.

^a n = 3, ^b n = 4, ^c n = 5 para cada nivel de radiación

Por último, tal y como se mostró en tabla 86 y se comentó en el apartado III.2.3.2. de esta sección, los alimentos que presentaron un mayor contenido en aminoácidos libres debido a los procesos de curado, fermentado y ahumado fueron el jamón serrano, el queso y el salmón ahumado respectivamente. Las hamburguesas, el jamón serrano ibérico y el salmón ahumado no contenían productos de degradación de los aminoácidos escogidos como marcadores. Por otra parte, el contenido en o-Tyr

aumentó con el aumento de la dosis de radiación aplicada en el jamón cocido, mientras que en el queso en lonchas los contenidos de *m*-Tyr y 5-OH-Trp sufrió cambios importantes por efecto de la radiación aplicada.

III.2.4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA ANOVA DE UN FACTOR

Con los datos recogidos en la tabla 90, y al igual que se realizó en el caso del contenido de aminoácidos, se efectuó un test de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor con el fin de detectar posibles diferencias significativas en el contenido de cada uno de los parámetros composicionales incluidos en el estudio entre una dosis de radiación y otra. En este apartado únicamente se comentarán los resultados obtenidos para el contenido de nitratos y nitritos, grasa, proteína y humedad, ya que los relativos a los aminoácidos se recogieron en la tabla 88 y en el apartado III.2.3.2. de esta sección.

En la tabla 92 se muestran la relación de varianzas (F) y los valores de probabilidad (P) obtenidos en este estudio. Tal y como se observa en dicha tabla, en la mayoría de los casos (excepto en el caso del contenido proteico del jamón serrano, hamburguesas, queso y salmón ahumado, cuyos valores-P se muestran en **negrita y cursiva**) los valores-P fueron menores de 0.05 lo que indica diferencias significativas en el contenido de cada uno de los parámetros entre un nivel de radiación y otro. Mediante el test de rango múltiple (MRT) se pudo comprobar entonces la dosis de radiación a partir del cual empezaban a aparecer tales diferencias significativas.

Respecto al jamón cocido, el test MRT mostró cambios significativos a un nivel de probabilidad del 95% en todos los casos entre las muestras irradiadas y las no irradiadas (muestras control) en la humedad, contenido proteico y contenido en nitratos y nitritos. Sin embargo en el contenido de grasa, las diferencias únicamente fueron significativas a un nivel de probabilidad de 95% cuando se aplican dosis de radiación de 4 kGy.

En el caso del jamón serrano ibérico, la humedad se vio alterada siguiendo el mismo patrón que en el jamón cocido, por el contrario en el caso de la grasa y del contenido en nitratos las diferencias significativas se hicieron notables a todas las dosis de radiación ensayadas.

Tabla 92. Resultado del test ANOVA para los datos de composición química obtenidos en cada uno de los alimentos RTE estudiados

RTE	Humedad		Proteína		Grasa		Nitritos		Nitratos	
	F	valor-P	F	valor-P	F	valor-P	F	valor-P	F	valor-P
Jamón cocido	25.21	0.0001	36.31	0.0001	104.97	0.0001	147.89	0.0001	304.40	0.0001
Hamburguesas	3.37	0.0481	0.32	0.8959	7.57	0.0048	-	-	-	-
Jamón serrano ibérico	4.08	0.0279	2.63	0.0593	184.80	0.0001	-	-	246.07	0.0001
Salmón ahumado	9.90	0.0013	0.95	0.4780	146.74	0.0001	-	-	951.42	0.0001
Queso en lonchas	15.83	0.0002	1.65	0.2122	23.85	0.0001	-	-	-	-

La variación del contenido de grasa, nitratos y humedad del salmón ahumado fue totalmente análoga a la observada en el jamón serrano ibérico. Los resultados obtenidos en estos tres alimentos parecen estar de acuerdo con los recogidos por Carrasco y col (111) y Brennan (79) quienes sugirieron la misma interacción entre la radiación ionizante con la grasa y el contenido en agua que la observada en este estudio.

En las hamburguesas, las diferencias significativas en el contenido de agua, comenzaron a ser notables en una dosis de 4 kGy, mientras que la grasa se modificó a todos los niveles aplicados. El test ANOVA sirvió para confirmar además la respuesta heterogénea de las muestras consideradas en el estudio frente a la radiación ionizante. Por último, el contenido en grasa del queso en lonchas se vio modificado a cualquier dosis de radiación, mientras que se observaron diferencias significativas en el contenido de agua únicamente a una dosis de 6 kGy, demostrando nuevamente la respuesta heterogénea de las muestras consideradas frente a la radiación. Con el fin de facilitar la visualización de las diferencias significativas entre los valores de los parámetros estudiados en los distintos niveles de radiación, en la figura 61, a modo de ejemplo, se muestran algunos gráficos de los valores medios de algunos parámetros obtenidos en este estudio.

Atendiendo a los resultados expuestos anteriormente, tanto el test ANOVA como el MRT permitieron confirmar estadísticamente la existencia de modificaciones en la composición de los alimentos estudiados causadas por la radiación ionizante, además de establecer la dosis de radiación a partir de la cual se producían dichas

modificaciones. Sin embargo el análisis de la varianza no permite establecer patrones o relaciones de cómo varía la composición del alimento en función de la radiación aplicada y del alimento.

En la figura 62 se muestra, a modo de ejemplo, para el jamón cocido, la matriz de dispersión de los datos obtenida en un análisis multivariable, donde se observa la variación simultánea de todos los parámetros composicionales considerados.

Este gráfico de dispersión permite establecer relaciones dos a dos entre los parámetros considerados en el estudio. En general tal y como se aprecia en esta figura, las relaciones entre las variables consideradas son bastante complejas. Sin embargo, pueden establecerse ciertas tendencias, así por ejemplo, la variación del contenido en nitritos y nitratos frente a la cantidad de proteína (figura 62 a. y 62. b), el contenido de nitratos frente a la humedad (figura 62 c.) o la del contenido de nitratos frente al de nitritos (figura 62 d.) muestran un comportamiento lineal a excepción de las muestras de control sin irradiar. En el caso de la variación de la grasa frente a la radiación o el contenido proteico frente a la grasa (figura 62 e y 62 f) siguen una tendencia sigmoideal a excepción de las radiaciones de 2 y 4 kGy.

Así pues, atendiendo a la complejidad de los datos y a las relaciones establecidas entre las variables estudiadas, se hizo necesaria la utilización de una aproximación multivariante, como el análisis de componentes principales (PCA), para establecer interacciones globales entre la dosis de radiación aplicada y los cambios químicos en la composición de cada uno de los alimentos listos para el consumo (RTE) seleccionados.

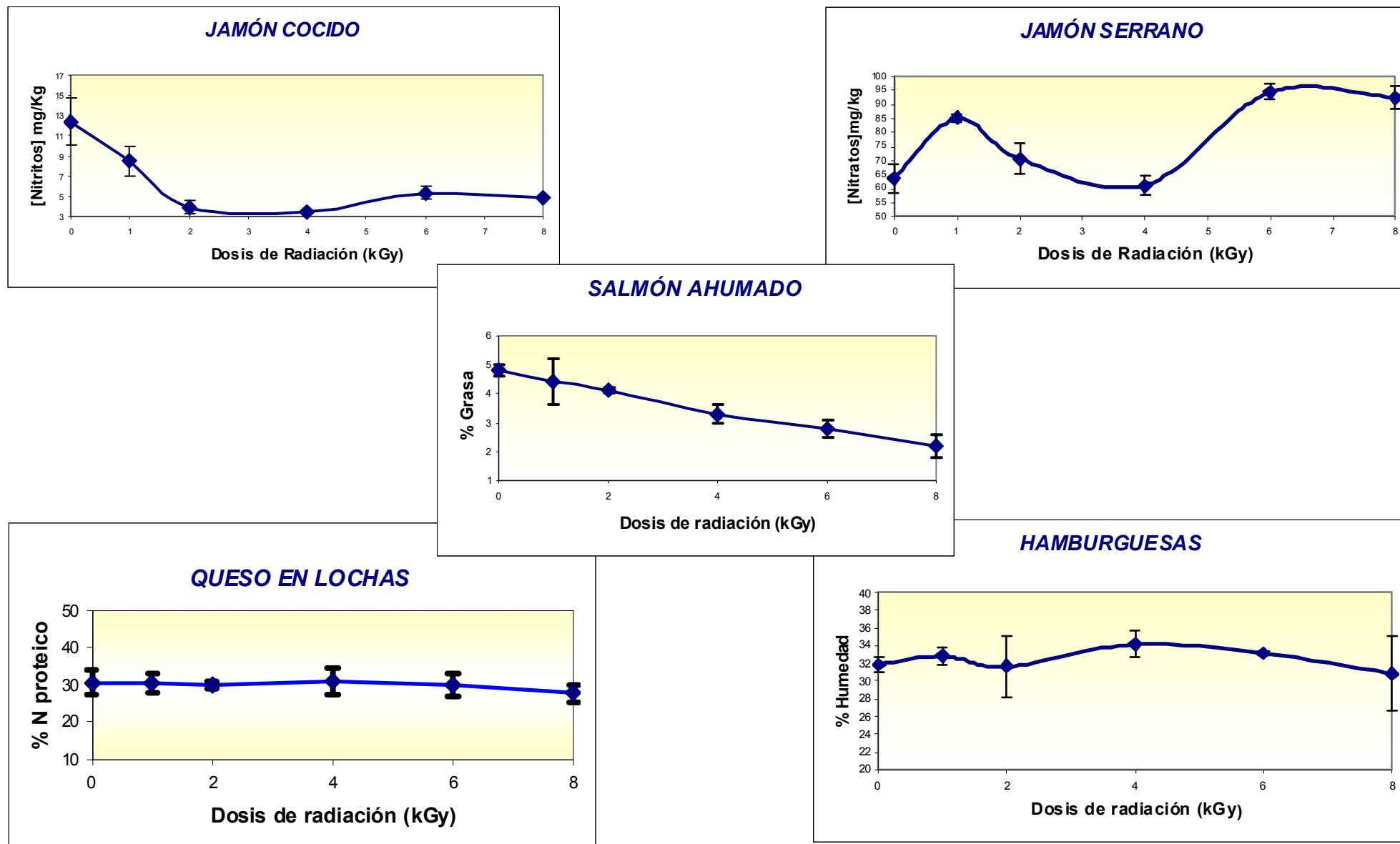


Figura 61. Gráficos de medias del análisis composicional de los distintos RTE estudiados

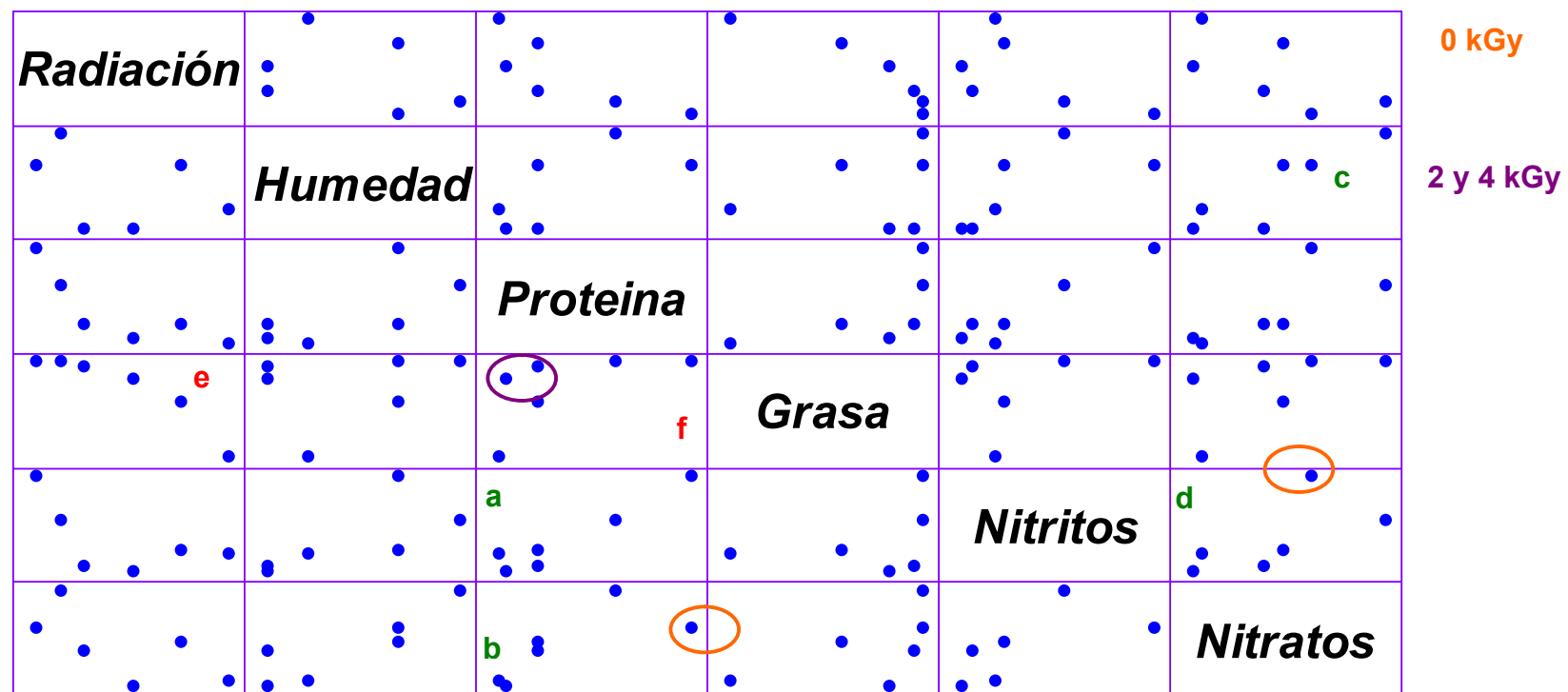


Figura 62. Matriz de dispersión del análisis composicional del jamón cocido

III.2.4.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

La representación simultánea de la relación entre los “scores” o vectores de proyección ortonormales (nivel de radiación en cada uno de los alimentos RTE seleccionados) y los “loadings” o vectores de carga (datos de la composición química de cada alimento) facilitaron la visualización de todos los datos experimentales. En la tabla 93 se recogen los valores propios así como la varianza acumulada obtenida en el análisis PCA.

Los valores propios mayores de 1 se seleccionaron para obtener el número de componentes principales que explican la variabilidad de los datos originales. Tal y como se observa en la tabla 92, la mayor parte de la variabilidad observada en el conjunto de datos se puede explicar con dos o tres componentes principales (PC). En el caso del salmón ahumado y las hamburguesas, dos componentes principales fueron suficientes para explicar el 81 % y 84 % respectivamente de la varianza acumulada. Sin embargo para el resto de alimentos estudiados la varianza acumulada se explicó entre un 87 % y un 94 % haciendo uso en este caso de tres componentes principales.

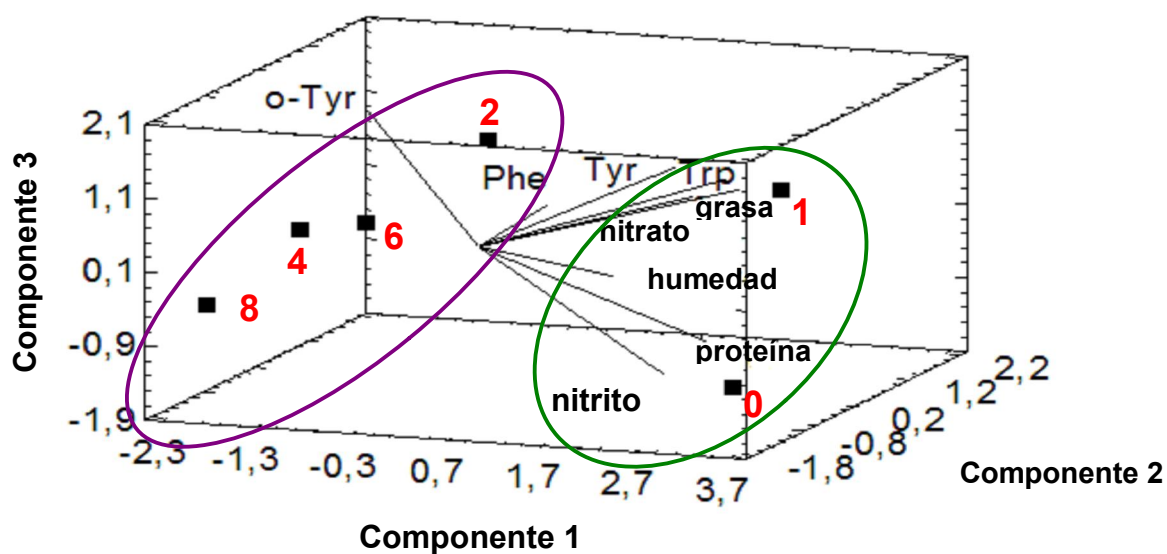
Tabla 93. Varianza explicada y valores propios obtenidos mediante el análisis de componentes principales

RTE	Número de componentes	Valores propios ^a	% Varianza explicada	
			Porcentaje de varianza explicada	Porcentaje acumulativo
Jamón cocido	1	5.71707	63.523	63.523
	2	1.37681	15.298	78.821
	3	1.22113	13.568	92.389
Jamón serrano	1	3.71864	46.483	46.483
	2	1.93145	24.143	70.626
	3	1.35416	16.927	87.553
Hamburguesas	1	3.12826	52.138	52.138
	2	1.94443	32.407	84.545
Salmón ahumado	1	3.06306	43.758	43.758
	2	2.60743	37.249	81.007
Queso en lonchas	1	3.86703	42.967	42.967
	2	2.93277	32.586	75.553
	3	1.44026	16.003	91.556

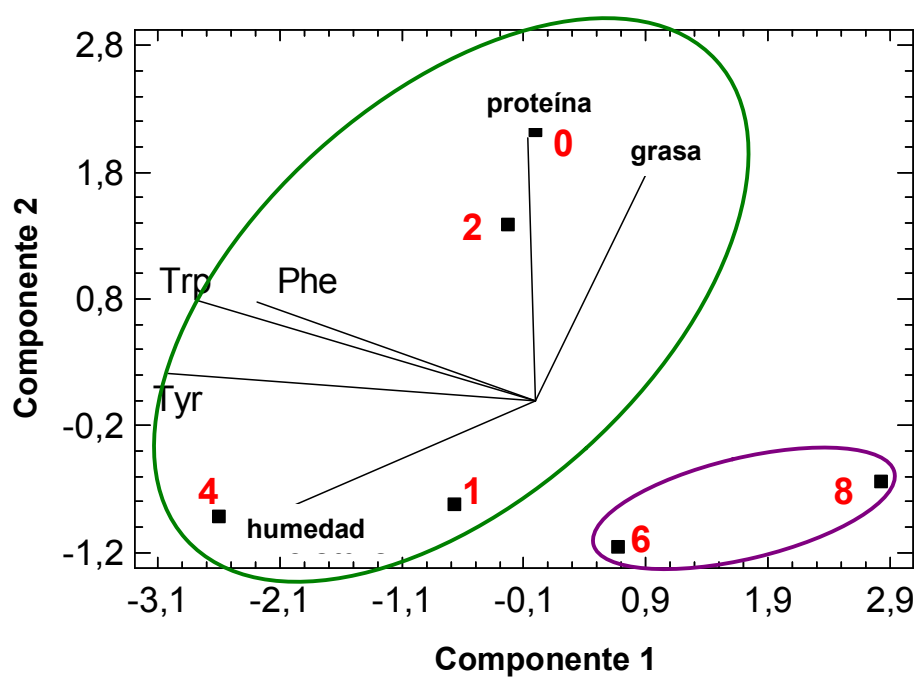
^a Los componentes con valores propios mayores o iguales a 1.0 han sido extraídos para explicar la variabilidad de los datos originales.

En la figura 63 se recogen las representaciones bidimensionales o tridimensionales de los gráficos biplot tanto para las observaciones como para cada variable.

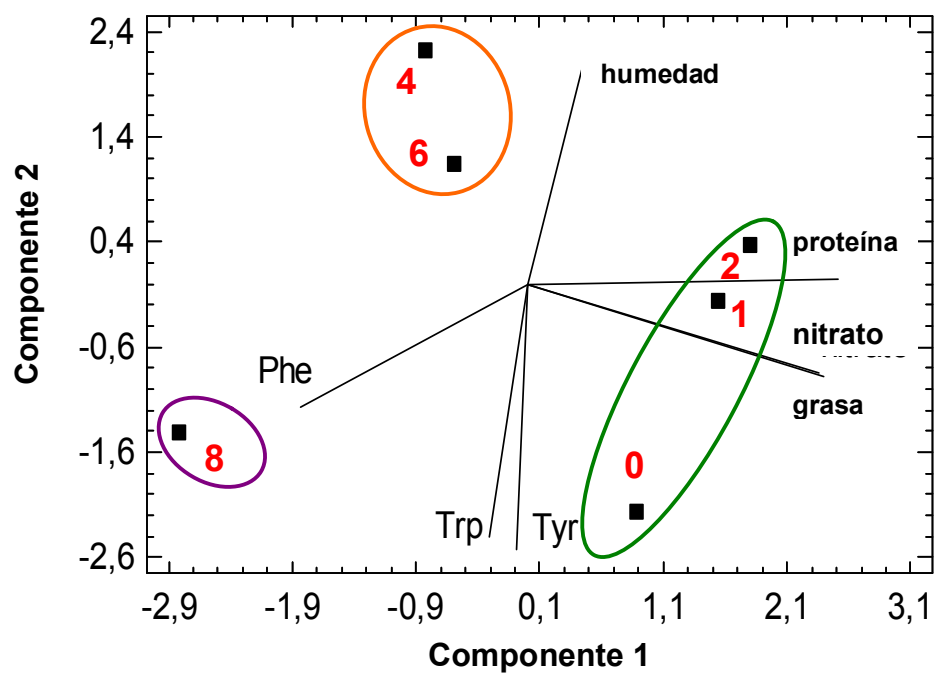
a) JAMÓN COCIDO



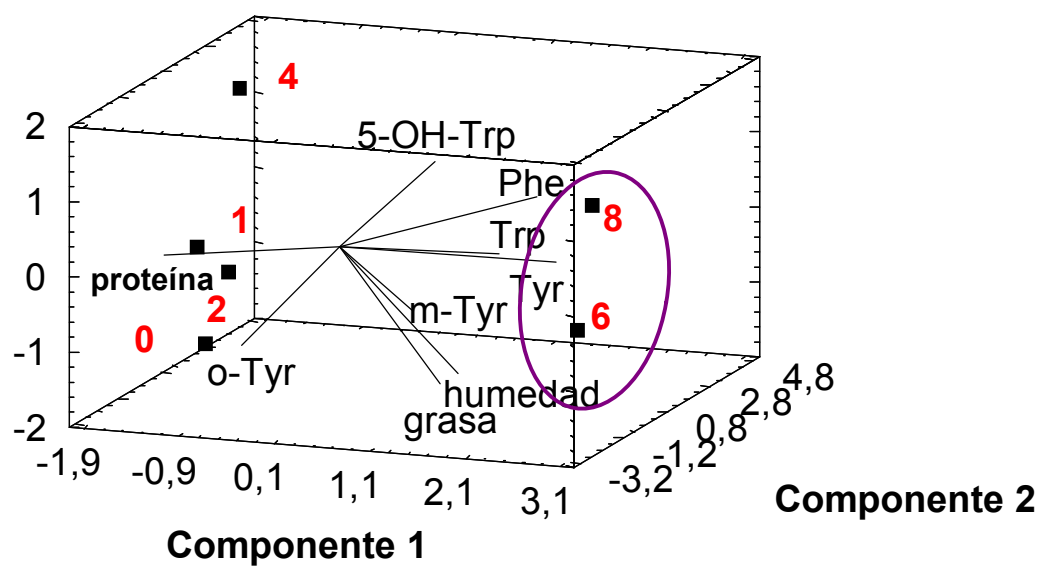
b) HAMBURGUESAS



c) SALMÓN AHUMADO



d) QUESO EN LONCHAS



e) JAMÓN SERRANO IBÉRICO

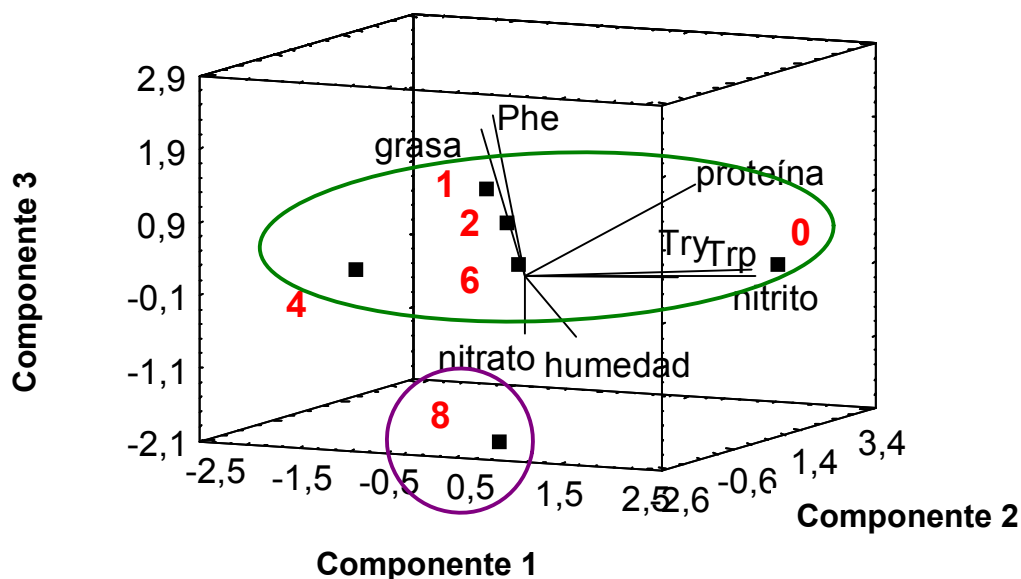


Figura 63. Gráficos combinados ("biplot") de la evaluación simultánea de la relación entre los "scores" (dosis de radiación) y los "loadings" (variables composicionales de los alimentos RTE). Los números marcados en rojo corresponden a la dosis de radiación expresada en kGy.

En el caso del jamón cocido y a pesar que los resultados del test ANOVA mostraban diferencias significativas para todas las variables estudiadas, el análisis PCA reveló (figura 63.a) que dichas diferencias significativas son de menor importancia cuando la dosis aplicada es de 1 kGy, ya que el vector de proyección correspondiente a dicha radiación se sitúa cerca de todos los vectores de carga y próxima a las muestras de control (0 kGy). Por otra parte, los vectores de proyección de las dosis entre 2 y 8 kGy se sitúan en el mismo lado de la representación biplot y de forma opuesta a los correspondientes a la dosis de 1 kGy y a las muestras control, lo que indica que las diferencias en la composición química del jamón cocido aparecen a partir de una radiación igual o mayor a 2 kGy. Por otra parte en la figura 63.a se pone de manifiesto que los vectores de carga correspondientes a los aminoácidos libres Trp, Tyr y Phe y al contenido proteico total, no presentan la misma dirección, por lo que la variación observada en el contenido de estos aminoácidos a dosis de radiación superiores a 2 kGy no puede ser atribuida exclusivamente a la variación en el contenido de proteína por radiolisis. En el jamón cocido, la formación de o-Tyr parece

ser consecuencia del el efecto de la radiación, sin embargo, y a pesar que algunos autores (126) sostienen que la formación de dicho producto de degradación de la Tyr está relacionada con un descenso en el contenido de Phe proporcional a la dosis de radiación absorbida por el alimento, en los resultados mostrados en el gráfico biplot para el jamón cocido la aparición de este compuesto se explica parcialmente. El aumento del contenido de *o*-Tyr podría relacionarse con el descenso observado en el contenido de nitritos, lo que evidencia el bajo poder protector de estos aditivos en el jamón cocido durante el proceso de irradiación.

Respecto a las hamburguesas (figura 63.b), los principales cambios en su composición química se producen a dosis de radiación comprendidas entre 6 y 8 kGy. Al igual que en el caso del jamón cocido, el gráfico biplot explica parcialmente la variación observada en el contenido de estos aminoácidos y por tanto dicho efecto no puede ser atribuido exclusivamente a la radiolisis proteica.

Tal y como se aprecia en el gráfico biplot para el salmón ahumado (figura 63.c), los vectores de proyección o “scores” se distribuyen principalmente en tres grupos. El primero de ellos corresponde a aquellas muestras sometidas a dosis de radiación bajas (1 y 2 kGy), el segundo a las tratadas a dosis intermedias (4 y 6 kGy) y el tercero a las correspondientes al tratamiento más intenso (8 kGy). Las muestras pertenecientes al primer grupo presentan prácticamente la misma composición química que las de control (0 kGy), sin embargo, aquellas tratadas a 8 kGy son las que muestran el contenido más alto de Phe. Los vectores de proyección correspondientes a 4 y 6 kGy, se sitúan en la parte superior central poniendo de manifiesto el evidente descenso de Tyr y Trp a estas dosis de radiación respectivamente.

Con respecto al queso en lonchas (figura 63.d) éste sufre modificaciones en su composición, sobretodo en el contenido de Tyr, Phe y Trp a las dosis de radiación más altas (6 y 8 kGy). Los cambios en el contenido de aminoácidos parecen estar relacionados con la alteración del contenido proteico ya que un incremento en la dosis de radiación, favorece la radiolisis de las proteínas incrementando por tanto el contenido en aminoácidos libres; hecho que por otra parte, también esta relacionado con la aparición de 5-OH-Trp inicialmente no presente en las muestras de control. Como se observa en la gráfica biplot, los loadings correspondientes al 5-OH-Trp y a la *o*-Tyr presentan direcciones opuestas, es decir el incremento del contenido de 5-OH-Trp, produce un descenso de *o*-Tyr, lo que indica que la radiación ionizante promueve tanto la formación del 5-OH-Trp como la eliminación de *o*-Tyr. De entre todos los

alimentos RTE seleccionados en el estudio, el jamón serrano ibérico es el menos afectado por la radiación ionizante. Tal y como se aprecia en la (figura 63.e) los vectores de proyección correspondientes a todas las dosis de radiación, excepto la de 8 kGy, se sitúan en la parte superior media cerca de los vectores de carga o vectores de dirección. A los valores mayores de radiación se muestra el descenso considerable del contenido de grasa y Phe y el incremento en el contenido en nitratos.

Los resultados obtenidos en el análisis por PCA están de acuerdo con los cambios observados anteriormente por Cabeza y col. (109) y por Medina y col. (137) en el caso de jamón cocido y salmón ahumado respectivamente. Estos autores sostienen además que la radiación ionizante en dosis de 1 kGy permite alcanzar el FSO establecido por la UE, pero que sin embargo, para alcanzar los criterios más estrictos impuestos por la USDA, se requiere una dosis de 2 kGy.

Así pues, atendiendo a este último criterio, se escogió la dosis de radiación de 2 kGy como dosis a la cual evaluar mediante PCA los cambios de composición producidos de los alimentos RTE escogidos en el estudio cuando son sometidos al tratamiento con radiaciones ionizantes a dicha dosis. En la figura 64 se muestra el gráfico de dispersión de la relación entre el tipo de alimento ("scores" vectores de proyección) y las variables composicionales (vectores de carga).

Tal y como se muestra en la figura 64, el alimento menos afectado en su composición por la radiación es el jamón serrano ibérico, mientras que los más afectados son el jamón cocido y las hamburguesas. El salmón ahumado y el queso en lonchas se modifican en mayor o menor medida según el parámetro composicional considerado.

Así pues el análisis mediante componentes principales a una dosis de 2 kGy muestra que el tratamiento mediante radiaciones ionizantes a esta dosis permite alcanzar el FSO en el jamón serrano sin modificar significativamente la composición del mismo.

DOSIS DE RADIACIÓN 2kGy

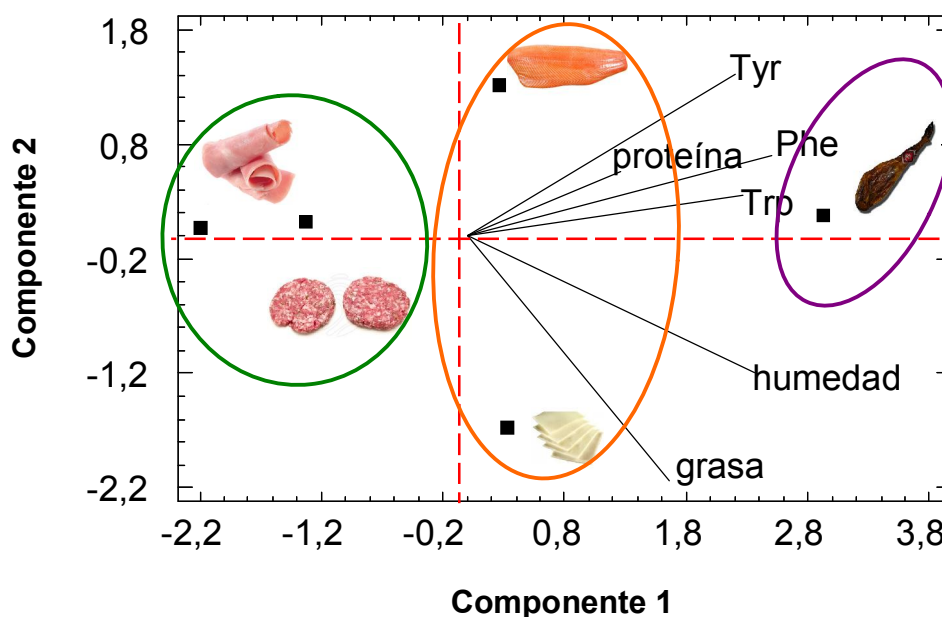


Figura 64. Gráficos de dispersión de la evaluación simultánea de la relación entre los vectores de proyección (diferentes alimentos RTE) y los vectores de carga (variables composicionales de los alimentos RTE) para una dosis de radiación de 2 kGy

III.2.4.5. REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE (MLR) PASO A PASO PARA LA EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN EL CONTENIDO DE NITRATOS Y NITRITOS

De acuerdo con las especificaciones del fabricante el jamón cocido y jamón serrano presentaban en su composición, con fines de conservación, nitritos y nitratos respectivamente. En el análisis mediante ANOVA y en el análisis por componentes principales se observan cambios significativos a un nivel de probabilidad del 95% en el contenido de dichos aditivos a las dosis de radiación consideradas en el estudio, lo que parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos por Carrasco y col (111) y por Honikel (462) quienes sugieren que tanto el contenido de nitratos como de nitritos puede modificarse tanto en el proceso de irradiación del alimento como en las operaciones de procesado del mismo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió aplicar la regresión lineal múltiple (MRL) paso a paso con el fin de estudiar y relacionar los cambios en los parámetros composicionales del alimento con los cambios observados en el contenido de nitratos y nitritos y la dosis aplicada. En el caso del jamón cocido el análisis por MRL se aplicó para modelizar los cambios en la concentración de nitrito, mientras que en el caso del jamón serrano para modelizar el contenido de nitrato.

Las ecuaciones matemáticas obtenidas tras el tratamiento matemático se muestran a continuación:

$$\text{Ec. [19]} \quad [\text{NO}_2^-] = 21.33 + 1.57 * \text{grasa} - 0.25 * \text{humedad} + 0.08 * \text{nitrato} + 1.78 * \text{proteína} + 5.01 * \text{radiación} - 6.15 * \text{Trp} + 1.09 * \text{Tyr} - 0.29 * \text{proteína} * \text{radiación}$$

$$\text{Ec. [20]} \quad [\text{NO}_3^-] = -525.78 - 0.025 * \text{grasa} * \text{humedad} * \text{radiación} + 24.92 * \text{grasa} + 6.987 * \text{humedad} - 7.15 * \text{nitrito} + 0.16 * \text{Phe} + 30.29 * \text{radiación} + 0.60 * \text{Trp} - 0.30 * \text{grasa} * \text{humedad}$$

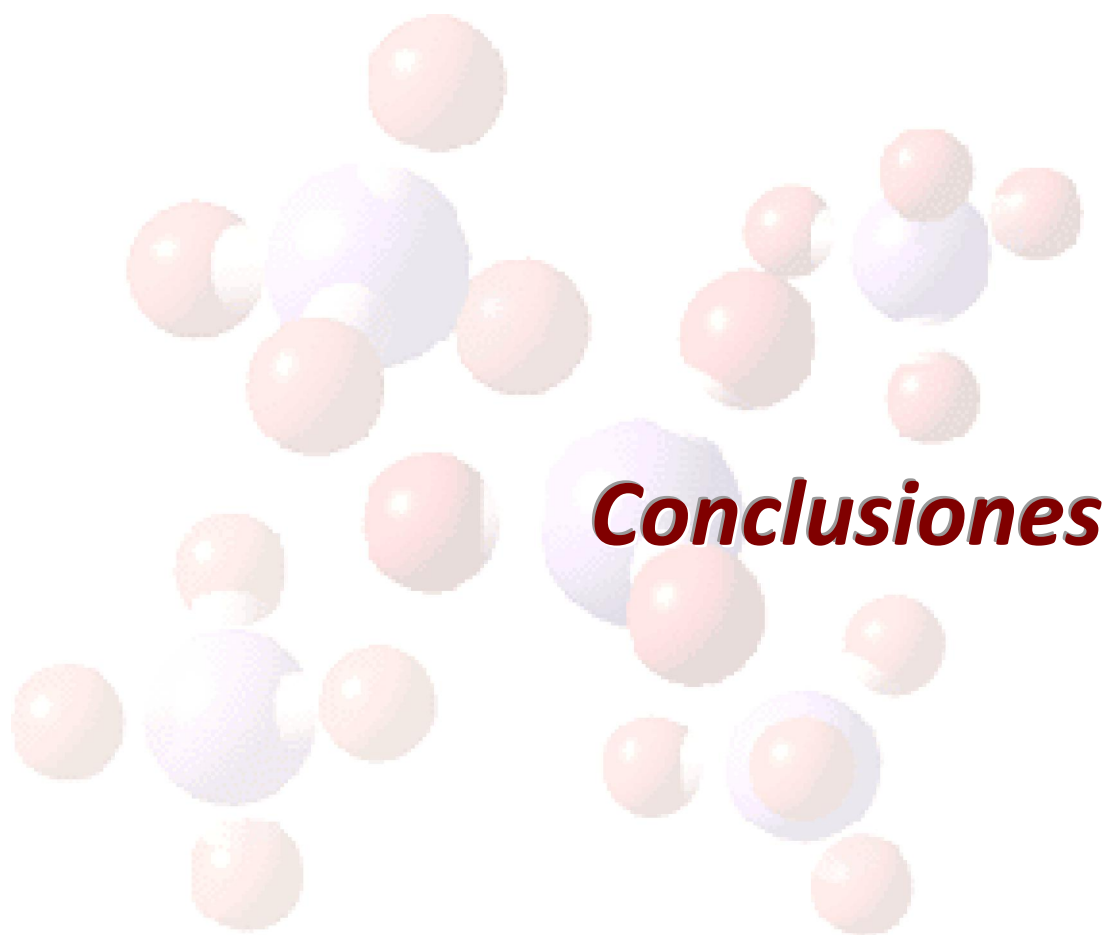
Las ecuaciones [19] y [20] explican el 97.69 % y el 94.53 % de la variabilidad en la concentración de nitritos y nitratos respectivamente. Los valores del error de estimación estándar (SEE) obtenidos en los modelos se encuentran entre 0.678 y 3.94 para los nitritos y nitratos respectivamente, lo que indica la fiabilidad de las ecuaciones obtenidas en cada caso.

Al igual que en el caso de los diseños experimentales detallados a lo largo de esta tesis, los coeficientes de regresión de cada uno de los modelos determinan el efecto de las variaciones de los parámetros composicionales considerados y de la dosis de radiación aplicada sobre las concentraciones de estos aditivos. Los p-valores calculados a un nivel de confianza del 95 % con un valor menor a 0.05, indican los parámetros que afectan de manera significativa a las concentraciones de nitratos y nitritos. Así pues de acuerdo con los valores de probabilidad obtenidos, las variables que más afectan a la concentración de nitritos son la proteína (valor-P = 0.0003), la dosis de radiación (valor-P = 0.0097) y factor de interacción proteína*dosis de radiación (valor-P = 0.0103). Con respecto a la concentración de nitratos, el factor de cruce grasa*humedad*radiación (valor-P = 0.0005), la dosis de radiación (valor-P = 0.0007) y la concentración de nitritos (valor-P = 0.0207) fueron los factores que presentaron mayor peso en el modelo.

Las ecuaciones obtenidas en el análisis por regresión múltiple demuestran que los cambios en la concentración de nitratos y nitritos dependen no solo de la dosis de radiación aplicada si no además de la interrelación de algunos de los factores composicionales considerados en el estudio (el factor de cruce proteína*dosis de radiación para los nitritos y grasa*humedad*radiación para los nitratos) Por tanto el descenso observado en la cantidad de nitritos cuando el jamón cocido es sometido a tratamiento mediante radiaciones ionizantes esta relacionado con los cambios en la cantidad de proteína mientras que en el caso del jamón serrano ibérico la interacción de la grasa y la humedad conducen a un aumento en el contenido de los nitratos proporcional a la dosis de radiación aplicada.

Todos los estudios realizados mediante herramientas quimiométricas han demostrado que existe una relación entre la radiación ionizante aplicada y las modificaciones observadas en la composición química de los alimentos RTE seleccionados y que, además, el efecto es distinto dependiendo del tipo y la composición del alimento tratado. En general los tratamientos a dosis de radiación altas (6 y 8 kGy) provocan cambios significativos en la composición del alimento, mientras que las dosis bajas (1 y 2 kGy) no presentan efectos adversos en los parámetros composicionales considerados.

El uso del análisis de componentes principales combinado con la regresión lineal múltiple puede ser una herramienta útil en la identificación de las modificaciones que ocurren en los alimentos tratados con radiaciones ionizantes y seleccionar por tanto las variables que deben considerarse para modelizar dichos cambios. La aplicación de herramientas quimiométricas hace posible establecer o predecir las alteraciones en el alimento a distintas dosis de radiación, identificar las causas de dichos cambios y relacionarlos entre si, haciendo posible determinar la aplicabilidad o idoneidad del tratamiento mediante radiaciones ionizantes según el tipo de alimento y asegurando la calidad del mismo y la aceptación del consumidor.



CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto la utilidad y eficacia de la cromatografía líquida quiral directa y los acoplamientos cromatográficos bidimensionales de tipo HPLC quiral-HPLC quiral para el análisis de la composición enantiomérica de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos. La técnica desarrollada en este trabajo permite el análisis quiral de estos herbicidas tanto si se encuentran en forma racémica o en distintas proporciones enantioméricas R-(+)/S-(-). Los procedimientos desarrollados permiten su aplicación a muestras complejas, como formulaciones comerciales y suelos. Además, estas metodologías han resultado de igual manera especialmente útiles en el análisis tanto de aminoácidos libres como de los enantiómeros L- y D- de los mismos, en distintos alimentos listos para el consumo, cuando el enantiómero L- se encuentra en una mayor proporción al enantiómero D.

Por otra parte, la cromatografía líquida capilar acoplada a la espectrometría de masas ha sido especialmente útil en el análisis de metabolitos de aminoácidos a niveles de concentración muy bajos en matrices tan complejas como el chocolate, con la ventaja adicional del menor consumo de disolventes orgánicos y la baja cantidad de residuos generada que presentan los sistemas capilares.

Los resultados más relevantes del trabajo que se presentan en esta Memoria se pueden resumir en las siguientes conclusiones.

PARTE I: HERBICIDAS ARILOXIFENOXIPROPIÓNICOS.
DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ENANTIÓMEROS DEL
DICLOFOP-ÁCIDO, DICLOFOP-METIL, QUIZALOFOP-ETIL, FLUAZIFOP-
BUTIL Y MEFENPYR-DIETIL MEDITANTE HPCL quiral DIRECTA y
ACOPLAMIENTOS CROMATOGRÁFICOS HPLC aquiral-HPLC quiral

1. Optimización de la separación de los enantiómeros de los herbicidas
ariloxifenoxipropiónicos mediante cromatografía quiral directa

- ✓ La columna CHIRAL-AGPTM basada en α_1 -glicoproteína ácida utilizada en esta tesis, ha permitido la separación de los enantiómeros tanto de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos diclofop-metil, diclofop-ácido, quizalofop-etil y fluazifop-butil, como del herbicida de tipo protector mefenpyr-dietil.
- ✓ El porcentaje de modificador orgánico en la fase móvil, el pH y la concentración de tampón fosfato del componente acuoso de la misma y la temperatura, tienen una gran influencia en la resolución de los enantiómeros, así como en la retención de los mismos.
- ✓ El diseño experimental y la aplicación de la metodología de superficie de respuesta ha permitido obtener gran información con un número mínimo de experimentos y evaluar la interacción de los diferentes efectos en las variables optimizadas. Los modelos matemáticos propuestos permiten evaluar tanto la influencia que sobre la separación quiral tienen estas variables y decidir cuáles de ellas son las más importantes, como establecer las condiciones cromatográficas que proporcionan una resolución enantiomérica aceptable en el menor tiempo de análisis posible.
- ✓ La aplicación análisis multirespuesta como herramienta de optimización ha permitido evaluar simultáneamente los factores estudiados, escogiendo como fases móviles óptimas de separación quiral una mezcla de 2-propanol-tampón fosfato 70 mM pH 7.0 (0.5:99.5 v/v) y (9:91 v/v) en el caso del diclofop-ácido y diclofop-metil respectivamente, 2-propanol-tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (5:95 v/v, T =20 °C), (7:93 v/v, T =17 °C) para el quizalofop-etil y fluazifop-butil y 2-propanol-tampón fosfato 10 mM pH 6.5 (9:91 v/v, T =15 °C) para el herbicida

de tipo protector mefenpyr-dietil, obteniendo en todos los casos resoluciones mayores o iguales a 0.78 en tiempos de análisis menores de 25 minutos.

- ✓ En las condiciones óptimas de separación quiral escogidas, se han obtenido límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero menores o iguales a 0.110 mg L^{-1} y 0.367 mg L^{-1} respectivamente. Los calibrados han sido lineales para todos los enantiómeros de los herbicidas estudiados en el intervalo de concentración de $0.250\text{-}80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil y $0.3\text{-}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para el diclofop-ácido y diclofop-metil. La reproducibilidad expresada como coeficiente de variación, de la resolución enantiomérica expresada, ha oscilado entre el 1.2 y 5.0 %, y 0.66 y 5.70 % en el caso del tiempo de retención corregido. Por otra parte el método optimizado también a permitido en el caso del fluazifop-butil y quizalofop-etil, la determinación de mezclas de enantiómeros no racémicas, oscilando entre proporciones enantioméricas R-(+)/S- (-) de 80:20 a 95:5.

2. Aplicación de las herramientas de deconvolución a la cromatografía líquida quiral

- ✓ Las herramientas matemáticas de deconvolución han permitido evaluar el área de los picos cromatográficos de los enantiómeros del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil, minimizando el error debido al ensanchamiento de la cola del pico y a la aparición de picos asimétricos en la integración de los mismos, lo que se ha traducido en una mejora de los resultados de cuantificación, sobre todo en aquellos casos en que no se ha podido alcanzar resoluciones aceptables del par enantiomérico o cuando los enantiómeros de encuentran en distintas proporciones R-(+)/ S-(-), mejorando por tanto, el cálculo de las relaciones y fracciones enantioméricas.
- ✓ Las deconvoluciones llevadas a cabo con los cromatogramas experimentales mediante el modelo matemático basado en una función Gaussiana exponencialmente modificada (EMG), mostraron en todos los casos coeficientes de correlación del modelo (R^2) en el intervalo 99.7-99.9 %, lo que supone una buena correlación existente entre los cromatogramas obtenidos experimentalmente y los deducidos mediante el modelo matemático.

- ✓ El estudio estadístico mediante el test t de Student de comparación de medias reveló la existencia de diferencias significativas, a un nivel de confianza del 95 %, entre los valores de relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (ER) obtenidos mediante el método de habitual de integración de caída de valle (VDM) y el modelo matemático EMG utilizado en la deconvolución de los enantiómeros del fluazifop-butil y quizalofop-etil. Únicamente en el caso del mefenpyr-dietil, los resultados obtenidos mediante ambos métodos de integración fueron comparables.
- ✓ Los valores de las relaciones y fracciones enantioméricas proporcionadas por la función EMG se encuentran próximos a los valores teóricos típicos de mezclas racémicas de 1 y 0.5 respectivamente en todos los experimentos realizados, tanto en el caso que de ensayos de picos cromatográficos que proporcionan enantioresoluciones bajas, medias y altas.

3. Optimización de la separación cromatográfica simultanea de los enantiómeros del diclofop-ácido y diclofop metil mediante HPLC quiral directa unidimensional.

- ✓ Debido a la diferencia en la composición de las fases móviles empleadas en la separación cromatográfica de los enantiómeros del diclofop-metil y su producto de hidrólisis diclofop ácido, no es posible llevar a cabo la separación enantiomérica simultánea de ambos herbicidas mediante elución en modo isocrático.
- ✓ El gradiente de elución en un solo paso en el que se cambia la fase móvil de separación enantiomérica del diclofop-ácido por la correspondiente a la separación de los enantiómeros del diclofop-metil, permitió alcanzar límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero menores o iguales a a 0.150 mg L⁻¹ y 0.500 mg L⁻¹ respectivamente. La linealidad se ha establecido en el intervalo de 0.25-50.0 mg L⁻¹ para los enantiómeros del diclofop-ácido y 0.50-50.0 mg L⁻¹ para el diclofop-metil. La reproducibilidad de la relación y fracción enantiomérica expresada como coeficiente de variación, ha oscilado entre el 1.0 % y 3.0 %.

4. Determinación cromatográfica de los enantiómeros del diclofop-ácido y diclofop metil mediante cromatografía líquida bidimensional HPLC aquiral – HPLC quiral

- ✓ El sistema de acoplamiento HPLC aquiral-HPLC quiral desarrollado ha permitido el análisis quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos.
- ✓ El diseño experimental y análisis de superficie de respuesta mediante la aplicación de un diseño experimental completo de tres niveles, permitió el establecimiento de condiciones de separación ortogonales para los sistemas involucrados. La optimización de la fase móvil en la separación primaria se realizó escogiendo como factores, la proporción de metanol de la fase móvil y el pH del tampón fosfato 30 mM del componente acuoso de la misma. Llegando a un compromiso entre los factores evaluados se ha tomado como fase móvil óptima una mezcla de metanol-tampón fosfato 70 mM pH 7.0 (73:27 v/v). En estas condiciones, la separación entre los picos cromatográficos del diclofop-ácido y los del diclofop-metil fue de 19.70 min, en un tiempo de análisis menor a 27 minutos.
- ✓ El cambio de las fases móviles implicadas en el acoplamiento, afectaba en poca medida a la separación enantiomérica del diclofop-ácido y diclofop-metil en cuanto a la enantioresolución y tiempos de retención se refiere.
- ✓ Debido a la pérdida de sensibilidad del acoplamiento cromatográfico bidimensional, el tiempo de transferencia desde la columna primaria (C_{18}) a la columna secundaria (quiral) se consideró el factor más importante a tener en cuenta a la hora de la optimización. Así por tanto, se tomó como tiempo de transferencia óptimo aquel que permite alcanzar la máxima sensibilidad (máxima área de pico cromatográfico para los enantiómeros). En el caso del diclofop-ácido, este tiempo fue de 15 s (aproximadamente un volumen de transferencia de 0.25 mL), mientras que para el diclofop-metil fue de 38 s (aproximadamente un volumen de transferencia de 0.63 mL).
- ✓ En las condiciones óptimas de operación, el acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral proporciona límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero menores o iguales a 3.2 mg L^{-1} y 10.1 mg L^{-1} respectivamente. El intervalo lineal para todos los enantiómeros de los

herbicidas estudiados está en el intervalo de concentración de 5-75.0 mg L⁻¹ para los enantiómeros del diclofop-ácido y 10-75.0 mg L⁻¹ para los del diclofop-metil. La reproducibilidad de la relación y de la fracción enantiomérica expresada como coeficiente de variación, ha oscilado entre el 2 % y 10 %.

5. Determinación cromatográfica de los enantiómeros de los herbicidas seleccionados en muestras

Determinación quiral del quizalofop-etil, fluazifop-butil y mefenpyr-dietil en suelos

- ✓ La extracción sólido-líquido en baño de ultrasonidos a temperatura ambiente ha permitido la extracción cuantitativa de los enantiómeros de los herbicidas ariloxifenoxipropiónicos, así como de los del herbicida protector considerados, evitando su transformación y manteniendo a su vez inalterados los ésteres de los mismos.
- ✓ El procedimiento de extracción suave por agitación en baño de ultrasonidos junto con el empleo de la cromatografía quiral directa, combinada, a su vez, con un tratamiento de la señal cromatográfica mediante herramientas de deconvolución, ha resultado un método sencillo, rápido, eficaz y reproducible para la determinación quiral de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos (quizalofop-etil y fluazifop-butil) y de tipo protector (mefenpyr-dietil) en suelos.
- ✓ Los límites de detección alcanzados para los extractos de suelo han estado comprendidos entre 0.047 y 0.563 µg g⁻¹, mientras que los de cuantificación han variado entre 0.155 µg g⁻¹ y 1.875 µg g⁻¹, permitiendo así el análisis de estos herbicidas a los niveles esperados en suelos. Las recuperaciones obtenidas a niveles de adición comprendidos entre 0.5 -9 µg g⁻¹ han oscilado en el intervalo 71-94 % con una reproducibilidad expresada como coeficiente de variación comprendida entre 1-6%.

Determinación quiral del diclofop-metil y diclofop-ácido en el preparado comercial SIROFOP® mediante HPLC quiral directa unidimensional

- ✓ El método de separación quiral unidimensional simultáneo permite analizar diclofop-ácido y diclofop-metil en el herbicida comercial SIROFOP®. Dicho análisis confirmó la presencia de pequeñas cantidades de diclofop-ácido en el preparado comercial no especificado por el fabricante, probablemente derivadas de pequeñas impurezas en el proceso de síntesis.
- ✓ En todas las muestras de SIROFOP® analizadas se obtuvieron valores de relación enantiomérica (ER) y fracción enantiomérica (EF), comprendidas entre 0.98-1.03 y 0.49-0.51 respectivamente, para el diclofop-metil, mientras que para el diclofop-ácido a todos los niveles de concentración se encontraron comprendidos entre 0.76 y 0.90 mientras que los valores EF fueron entre 0.42 y 0.47, inferiores a las típicas de sustancia racémicas debido a la influencia de un intenso pico de materia endógena propia de la matriz que solapaba parcialmente con el primer enantiómero eluido del diclofop-ácido, dificultando el análisis quiral de dicho herbicida en el preparado comercial.
- ✓ La aplicación de la función EMG como modelo matemático de deconvolución permitió discriminar el área de pico del primer enantiómero de dicho herbicida con el pico correspondiente a la matriz de la muestra de suelo. Una vez deconvolucionados los cromatogramas, se determinaron con mayor exactitud los valores de ER y EF obtenidos para el diclofop-ácido que estuvieron comprendidos entre 0.99-1.00 y 0.48-0.50 respectivamente, valores mucho más próximos a los esperados en una mezcla racémica. En el caso del diclofop-metil también mejoró el resultado calculado; 1.00-1.01 para la ER y 0.49-0.50 para la EF. El test t de Student de comparación de medias de dos series reveló diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % en los valores de ER y EF obtenidos mediante la integración VDM y EMG únicamente en el caso del diclofop-ácido.

Determinación quiral del diclofop-metil y diclofop-ácido en el preparado comercial SIROFOP® mediante acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral

- ✓ El acoplamiento cromatográfico HPLC aquiral-HPLC quiral, permite determinar tanto la composición cuantitativa como enantiomérica del diclofop-ácido y diclofop-metil en el herbicida comercial SIROFOP®.

- ✓ Los resultados obtenidos en el análisis del preparado comercial SIROFOP® mediante la separación cromatográfica primaria en fase inversa, demostraron que efectivamente la concentración de diclofop-metil encontrada fue similar a la especificada por el fabricante, sin embargo casi un 6 % del diclofop-metil se encontraba en forma de su principal producto de hidrólisis diclofop-ácido en forma de impurezas provenientes del proceso de síntesis, el cual no aparecía recogido en las especificaciones técnicas del producto.
- ✓ El análisis quiral del preparado comercial mediante el acoplamiento cromatográfico optimizado, permitió comprobar que tanto el diclofop-metil como el diclofop-ácido se comercializaban efectivamente en forma de racemato. Los valores de relación y fracción enantiomérica obtenidos en el caso del diclofop-ácido oscilaron entre 0.98-1.03 y 0.49-0.51 respectivamente, mientras que para el diclofop-metil variaron entre 0.99-1.01 en la ER y 0.49-0.51 en el caso de la EF, es decir valores más próximos a la unidad y a 0.5, típicos de mezclas racémicas.
- ✓ El método de separación bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral optimizado permitió el análisis de diclofop-metil y diclofop-ácido en una muestra compleja proporcionando valores de descriptores quirales precisos. Aunque el acoplamiento bidimensional proporciona límites de detección mayores y por lo tanto menor sensibilidad que la determinación conjunta quiral unidimensional de ambos herbicidas, estos límites son suficientes para el análisis de dichos herbicidas a los niveles encontrados en formulaciones comerciales. Además, I proporciona cromatogramas más limpio evitando que la materia endógena propia de la matriz del herbicida interfiera en la determinación enantiomérica de los herbicidas objeto de estudio, no haciendo necesario por tanto el uso de herramientas de deconvolución para la estimación de las áreas de pico.

PARTE II

DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y SUS PRECURSORES L-TRIPTÓFANO Y 5-OH-TRIPTÓFANO, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

1. Optimización de la separación de serotonina y sus precursores mediante cromatografía capilar acoplada a espectrometría de masas

- ✓ Atendiendo a la naturaleza de la serotonina y sus precursores, 5-OH-triptófano y triptófano y de acuerdo con los estudios realizados, el porcentaje de modificador orgánico en la fase móvil y el pH de la misma, son factores influyentes en la retención de dichos analitos cuando se trabaja en cromatografía líquida capilar en fase inversa. La separación cromatográfica de la serotonina y sus precursores, requiere fases móviles de elevado contenido acuoso (al menos un 97%) para conseguir la retención de alguno de los analitos en la columna. La aplicación de un sencillo gradiente de elución en el que el porcentaje de modificador orgánico se varió de un 3% al 7%, permitió la elución de todos los analitos de la columna, evitando a su vez el ensanchamiento excesivo del pico correspondiente al triptófano.
- ✓ El pH de la fase móvil y la concentración del tampón del componente acuoso de la misma presentaron un marcado efecto en la eficacia de ionización de los analitos y por tanto en el área de pico en ESI- MS. Además cuando se trabaja en cromatografía capilar con grandes volúmenes de inyección es necesario alcanzar las condiciones óptimas de focalización, ya que el volumen y la naturaleza de la disolución de inyección y sobretodo la dispersión causada por la inyección de grandes volúmenes de muestra, presentan un efecto marcado en la anchura de los picos cromatográficos y en la retención de los compuestos que se eluyen al comienzo de la separación cromatográfica. La utilización del diseño experimental y la aplicación de la metodología de superficie de respuesta ha permitido identificar y evaluar las variables que más afectaban al área y anchura de pico y por tanto a la sensibilidad obtenida en cLC-MS cuando se utilizan grandes volúmenes de inyección. El empleo de un diseño experimental multifactorial personalizado, permitió optimizar los factores experimentales concentración de tampón formiato, pH del mismo, volumen de

inyección y naturaleza de la disolución de inyección. Los modelos matemáticos obtenidos a partir del diseño permitieron establecer las condiciones cromatográficas que proporcionan una máxima sensibilidad en ESI-MS (máxima área y mínima anchura de pico).

- ✓ La concentración del tampón formiato y el pH del mismo han presentado un efecto negativo en el área de pico de la serotonina y del L-triptófano. Este último factor también presentó un efecto importante en la anchura de pico de la serotonina y del L-triptófano. Mientras que en el caso de la serotonina, un aumento del pH producía una disminución en la anchura de pico, en el caso del triptófano y en menor medida en el 5-OH-triptófano se observó el efecto contrario. La naturaleza de la disolución de inyección presentó un efecto notable en la anchura de pico de la serotonina ya que cuando la inyección se realizó en disolución tamponada se obtuvieron picos más anchos, mientras que en el caso del triptófano y 5-OH-triptófano se observó el efecto contrario. La concentración del tampón únicamente mostró efecto en la anchura de pico de la serotonina, obteniendo los valores más altos a las concentraciones de tampón más altas.
- ✓ El empleo del análisis multirespuesta permitió evaluar simultáneamente los factores considerandos en el estudio, proporcionando las condiciones óptimas de separación cromatográfica. Llegando a un compromiso entre los factores evaluados, se escogió como fase móvil óptima una mezcla de acetonitrilo-tampón formiato 5 mM pH 4 (3:97 v/v) utilizando el gradiente de elución anteriormente mencionado, fijando el volumen de inyección en 10 μL , empleando agua como disolución de focalización.
- ✓ En las condiciones óptimas de operación se han obtenido límites de detección y de cuantificación calculados en modo SIM para cada analito menores o iguales a 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 1.65 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Los calibrados han sido lineales para todos los analitos en el intervalo de concentración de 3-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el caso del 5-OH-triptofano y la serotonina y 0.25-500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el L-triptófano. La reproducibilidad en el área y anchura de pico y del tiempo de retención de cada analito expresada como coeficiente de variación, ha oscilado entre el 2.3 y 5.3 %, y 1.1 y 2.8 % en el caso del área y la anchura respectivamente y 0.1 % y 0.8 % en el tiempo de retención.

- ✓ Los espectros de masas obtenidos revelaron la presencia de los iones moleculares característicos $[M+1]^+$, m/z 221 para el 5-OH-triptófano, m/z 177 para la serotonina y m/z 205 para el triptófano, además de fragmentos intensos $[M+1-17]^+$ correspondiente a la pérdida bien de un grupo $-OH$ o bien de un grupo $-NH_3$ en la serotonina (m/z 160) y en el 5-OH-triptófano (m/z 204) y (m/z 188) para el L-triptófano posiblemente debido a la pérdida de un grupo $-NH_3$.

2. Determinación de serotonina y sus precursores en muestras de chocolate con distinto contenido en cacao.

- ✓ El empleo de la cromatografía capilar mediante el uso de grandes volúmenes de inyección, combinada con un procedimiento de extracción suave en baño de ultrasonidos previa eliminación de la grasa con éter de petróleo, ha proporcionado un método sencillo, rápido, eficaz y reproducible para la determinación de la serotonina y sus precursores a los niveles de concentración más usuales de estos analitos ($\mu g \cdot g^{-1}$) en muestras de chocolate de distinto contenido en cacao (70-99 %).
- ✓ El empleo de la ecuación de Matuszewski, así como la comparación de las pendientes obtenidas en el calibrado externo y los calibrados sobre muestra, permitieron evaluar y estimar el ligero efecto matriz existente causado por los compuestos orgánicos presentes en la matriz que compiten con el analito en el proceso de formación de pequeñas gotas en el electrospray, en la determinación de la serotonina y sus precursores en chocolate,
- ✓ Los límites de detección en los extractos de chocolate han estado comprendidos entre 0.01 y 0.11 $\mu g \cdot g^{-1}$, mientras que los de cuantificación han variado entre 0.04 $\mu g \cdot g^{-1}$ y 0.41 $\mu g \cdot g^{-1}$, permitiendo así el análisis de estos analitos a los niveles esperados en el chocolate. Las recuperaciones obtenidas a niveles de adición comprendidos entre 2.5-9.0 $\mu g \cdot g^{-1}$ han oscilado en el intervalo 76-97 % con una reproducibilidad expresada como coeficiente de variación comprendida entre el 1-7 %
- ✓ En ninguna de las variedades de chocolate consideradas se detectó la presencia de 5-OH-triptófano. Sin embargo tanto el L-triptófano como la serotonina se encontraron en cantidades significativas independientemente del

contenido de cacao del chocolate. El contenido más alto de L-triptófano ($13.27\text{--}13.34\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) se encontró en aquellas muestras de chocolate con el menor contenido en cacao (70-85%), mientras que en el caso de la serotonina, el mayor contenido se observó en el chocolate con un contenido de cacao del 85% ($2.93\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$).

PARTE III

DETERMINACIÓN DE D-AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS TRATADOS CON RADIACIONES IONIZANTES. ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN SU COMPOSICIÓN

1. Optimización de la separación de los enantiómeros de los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano mediante cromatografía quiral directa

- ✓ La columna CHIROBIOTIC-T basada en el antibiótico macrocíclico teicoplanina ha permitido la separación de los enantiómeros de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano. La proporción y el tipo de modificador orgánico en la fase móvil y la presencia o no de solución reguladora en la misma, influyen tanto en la resolución de los enantiómeros como en la enantioselectividad de los mismos.
- ✓ Los diseños experimentales efectuados mostraron que la utilización de acetato amónico o acetato de trietilamina (TEAA) en la disolución reguladora, en general, presenta un efecto negativo tanto en la enantioselectividad como la resolución de los enantiómeros. Por otra parte el metanol presenta el efecto contrario sobre ambas repuestas, es decir, un aumento en la proporción del mismo implica un aumento de la enantioselectividad y resolución enantiomérica.
- ✓ El análisis multirespuesta permitió llegar a un compromiso entre los factores evaluados y escoger como fase móvil óptima una mezcla de metanol-agua (90:10 v/v), obteniendo en todos los casos resoluciones y valores de

enantioselectividad mayores o iguales a 2.68 y 1.91 respectivamente en tiempos de análisis menores de 5 minutos.

- ✓ Los límites de detección y de cuantificación para cada enantiómero en las condiciones óptimas de separación, fueron menores o iguales a 0.085 mg L^{-1} y 0.28 mg L^{-1} respectivamente. Los calibrados han sido lineales en el intervalo de concentración $0.200\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso de los isómeros L-y D- de la tirosina y $0.300\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.100\text{-}50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los de la fenilalanina y triptófano respectivamente. La reproducibilidad de la resolución enantiomérica expresada como coeficiente de variación ha oscilado entre el 2.0 y 4.3 %, y para el caso de enantioselectividad entre 1.9 y 4.5 %.

2. Determinación cromatográfica de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano así como de sus principales productos de degradación o- y m- tirosina y 5-OH-triptófano mediante cromatografía líquida bidimensional HPLC aquiral – HPLC quiral

- ✓ La gran similitud de tiempos de retención en la separación de los enantiómeros de los aminoácidos aromáticos, hace que no sea posible un análisis simultáneo en modo isocrático de los seis enantiómeros, requiriendo por tanto para dicho fin, un acoplamiento cromatográfico bidimensional de tipo HPLC aquiral- HPLC quiral.
- ✓ El establecimiento de las condiciones de ortogonalidad de los sistemas involucrados en el acoplamiento HPLC aquiral-HPLC, requirió de un estudio sistemático de la fase móvil y la naturaleza de la fase estacionaria de la columna empleada en la separación primaria, para buscar un compromiso entre el tiempo total de análisis y el tiempo de elución transcurrido entre un aminoácido y otro. La fase estacionaria compuesta de ligandos C_{18} difuncionalmente unidos y una fase móvil de composición metanol-tampón acetato amónico 20 mM pH 6 (6:94 v/v) permitieron la separación primaria de los tres aminoácidos objeto de estudio sí como de sus principales productos de degradación o- y m- tirosina y 5-OH-triptófano en un tiempo de análisis menor a 20 minutos.

- ✓ El cambio de las fases móviles implicadas en el acoplamiento, afecta en poca medida a la separación de los enantiómeros de la tirosina, fenilalanina y triptófano en la segunda dimensión. Los tiempos de retención de los enantiómeros L- y D-, la anchura de pico, la resolución y la enantioselectividad se modifican ligeramente al cambiar de una fase a otra.
- ✓ El tiempo de transferencia óptimo resultó ser aquel que proporcionase un valor de relación enantiomérica más próximo a la unidad y que además permitiese una determinación correcta del enantiómero L-. Dicho tiempo fue de aproximadamente de 2 s para cada aminoácido (aproximadamente un volumen de transferencia de 33 μL).
- ✓ Los límites de detección y de cuantificación obtenidos para cada enantiómero operando en condiciones óptimas del acoplamiento cromatográfico bidimensional HPLC aquiral-HPLC, fueron menores o iguales a 3 mg L^{-1} y 10 mg L^{-1} respectivamente. El intervalo lineal para todos los enantiómeros en encuentra en el intervalo de concentración de 4-150 mg L^{-1} y 5-150 mg L^{-1} para los enantiómeros de la tirosina, 10-200 mg L^{-1} y 12-200 mg L^{-1} en el caso de la fenilalanina y 3-50 mg L^{-1} y 2-50 mg L^{-1} para los enantiómeros del triptófano. La reproducibilidad de la relación y de la fracción enantiomérica expresada como coeficiente de variación, ha oscilado entre el 1.0 % y 4.0 %. Estas mismas condiciones óptimas también a permitido la determinación de mezclas de enantiómeros no racémicas de distintas proporciones enantioméricas L-/D- oscilando entre valores de exceso enantiomérico 88.2-98.5 %.

3. Determinación de las posibles transformaciones de la tirosina, fenilalanina y triptófano en alimentos listos para el consumo (RTE) tratados con radiaciones ionizantes

- ✓ El empleo de un procedimiento de extracción suave en ultrasonidos en medio ligeramente ácido y antioxidante a temperatura ambiente que evita las transformaciones quirales de los aminoácidos estudiados, combinado con la cromatografía bidimensional HPLC aquiral-HPLC quiral, ha proporcionado un método sencillo, rápido, eficaz y reproducible para la determinación tanto de los aminoácidos libres tirosina, fenilalanina y triptófano y sus productos de degradación, como sus D-enantiómeros generados en muestras de alimentos

listos para el consumo RTE tratados con radiaciones ionizantes con fines de higienización a los niveles de concentración más usuales de estos analitos en alimentos ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

- ✓ La separación cromatográfica primaria en fase inversa permitió establecer la cantidad de aminoácidos libres en cada alimento, así como sus transformaciones debidas al efecto de la radiación ionizante. De entre los alimentos estudiados, el salmón ahumado, el queso en lonchas y el jamón serrano ibérico son los alimentos que presentaron mayor contenido en aminoácidos libres, debido a la acción proteolítica producida en los procesos de fermentado, curado y ahumado.
- ✓ El empleo de electrones acelerados con fines higienizantes mostraron alteraciones en el contenido de estos aminoácidos libres. En el análisis del jamón cocido y el jamón serrano ibérico se observaron diferencias significativas con respecto al alimento no tratado en el contenido de Tyr y Trp para una dosis de radiación de 4 kGy y en el caso de la Phe en el jamón serrano ibérico a partir de una dosis de 6 kGy. En el caso de las hamburguesas las diferencias significativas en el contenido de todos los aminoácidos son evidentes a partir de una radiación de 4 kGy, mientras que en el queso en lonchas, todos los niveles de radiación estudiados mostraron diferencias significativas en el caso de de la Phe y el Trp, y únicamente en la Tyr estas diferencias se dieron a partir de una dosis de radiación de 2 kGy. Finalmente, en el salmón ahumado el contenido en Tyr y Trp se modificó a partir de un nivel de 2 kGy y 4 kGy respectivamente y los niveles de Phe únicamente se modificaron a la dosis de radiación estudiada más alta (8 kGy).
- ✓ Con respecto a los productos de degradación de los aminoácidos estudiados, únicamente se detectaron pequeñas cantidades de *o*-Tyr en jamón cocido, mientras que en el queso en lonchas se encontraron tanto los productos de degradación de la Tyr, *o*- y *m*- Tyr, como el derivado hidroxilado del triptófano 5-OH-Trp. En el caso del jamón cocido las diferencias significativas en el contenido de *o*-Tyr aparecen a radiaciones por encima de 1 kGy, mientras que en el queso en lonchas las diferencias significativas en el contenido de *o*- y *m*- Tyr y 5-OH-Trp son notables en cualquier dosis de radiación aplicada.

- ✓ El uso de la segunda dimensión con la columna quirral de teicoplanina permitió evaluar la posible racemización de los aminoácidos libres. A pesar de que los estudios realizados sobre patrones mostraron que el tratamiento con radiaciones ionizantes provoca racemización en cierta extensión sobretudo a las dosis más altas estudiadas, en ninguno de los alimentos estudiados y a ninguna de las radiaciones aplicadas se detectó la presencia de D-aminoácidos a los niveles de detección del método propuesto.
- ✓ El uso de este tipo de acoplamientos en el análisis de muestras complejas, proporciona cromatogramas más limpios y sensibilidad suficiente evitando posibles etapas previas de limpieza de la muestra y preservando la integridad de la columna, garantizando así el buen funcionamiento de la misma durante un número elevado de análisis.

4. Evaluación mediante herramientas quimiométricas del efecto de la radiación ionizante en la composición química de los alimentos listos para el consumo

- ✓ El empleo de herramientas quimiométricas ha demostrado que los efectos provocados en la composición química del alimento cuando éste es sometido a un tratamiento higienizante con radiaciones ionizantes, no solo dependen de la dosis aplicada, sino también del tipo de alimento tratado y de la composición del mismo.
- ✓ El tratamiento con radiaciones ionizantes puede afectar tanto a los componentes mayoritarios (humedad, el contenido en grasa y el de proteína) como minoritarios (aminoácidos libres) de los alimentos, así como a los aditivos (nitratos y nitritos) incorporados durante las operaciones de procesado de los mismos.
- ✓ El análisis composicional de los alimentos RTE escogidos en el estudio demostró que el jamón cocido, jamón serrano ibérico y salmón ahumado presentaban nitratos en su composición, mientras que únicamente se detectó la presencia de nitritos en las dos variedades de jamón estudiadas. El descenso observado en el contenido de nitratos y nitritos parece ser

dependiente de la dosis de radiación. El contenido de proteína y de humedad fueron los parámetros menos modificados por la radiación en todos los alimentos considerados mientras que el contenido en grasas únicamente se mantuvo similar en el caso de las hamburguesas.

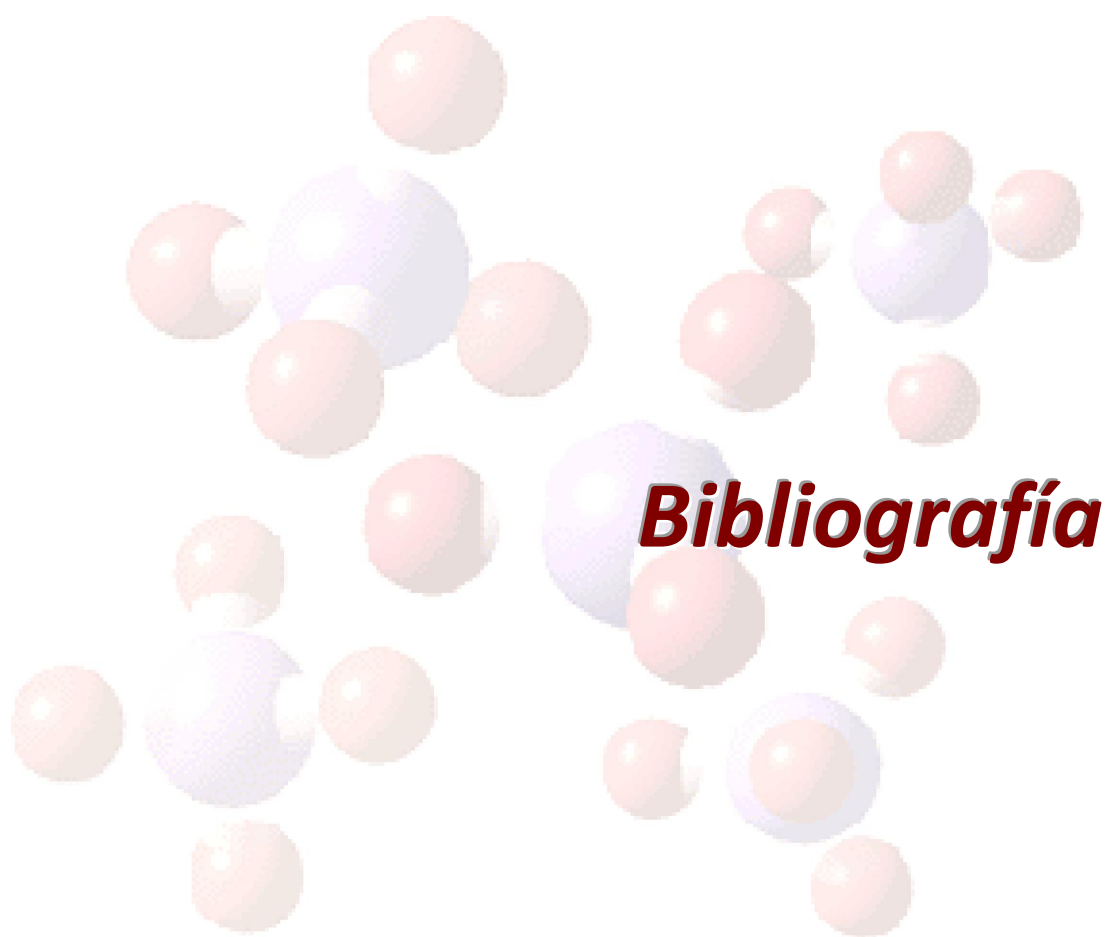
- ✓ El empleo del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor permitió confirmar diferencias significativas en el contenido de cada uno de los parámetros composicionales incluidos en el estudio y mediante el test de rango múltiple (MRT) se pudo determinar la dosis de radiación a partir del cual empezaban a aparecer tales diferencias significativas. Sin embargo, el análisis de la varianza no permitió establecer patrones o relaciones de cómo varía la composición del alimento en función de la radiación aplicada y del alimento.
- ✓ Atendiendo a la complejidad de los datos y a las relaciones establecidas entre las variables estudiadas, se hizo necesaria la utilización de una aproximación multivariante como el Análisis de Componentes Principales (PCA) que ha permitido establecer interacciones globales entre la dosis de radiación aplicada y los cambios químicos en la composición de cada uno de los alimentos listos para el consumo (RTE) seleccionados:
 - *Jamón cocido*: Las diferencias significativas en las variables composicionales consideradas son de menor importancia cuando la dosis aplicada es de 1 kGy.
 - *Hamburguesas*: Los principales cambios en su composición química se produjeron a dosis de radiación comprendidas entre 6 y 8 kGy.
 - *Salmón ahumado*: Según los cambios observados en la composición las muestras se distribuyeron en tres grupos, el primero de ellos correspondiente a aquellas muestras sometidas a dosis de radiación bajas (1 y 2 kGy), el segundo a las tratadas a dosis intermedias (4 y 6 kGy) y el tercero a las correspondientes al tratamiento más intenso (8 kGy).
 - *Queso en lonchas*: Éste sufrió modificaciones en su composición a las dosis de radiación más altas (6 y 8 kGy).
 - *Jamón serrano ibérico*: De entre todos los alimentos RTE seleccionados en el estudio, éste fue el alimento menos afectado por la radiación ionizante.

- ✓ El análisis mediante componentes principales a una dosis de 2 kGy mostró que el tratamiento mediante radiaciones ionizantes a esta dosis permite alcanzar el FSO, siendo el jamón serrano el alimento en el que menos se modificaba significativamente su composición.
- ✓ El análisis mediante regresión múltiple de los datos obtenidos en aquellos alimentos listos para el consumo en los que se añaden nitratos y nitritos con fines de conservación, ha permitido establecer la relación entre la variación en el contenido de dichos aditivos, la dosis de irradiación aplicada y la composición del alimento.
- ✓ Las ecuaciones obtenidas mediante análisis por regresión múltiple, demostraron que los cambios en la concentración de nitratos y nitritos dependen no solo de la dosis de radiación aplicada si no, además, de la interrelación de algunos de los factores composicionales considerados en el estudio (el factor de cruce proteína*dosis de radiación para los nitritos y grasa*humedad*radiación para los nitratos).
- ✓ Todos los estudios realizados mediante herramientas quimiométricas han demostrado que existe una relación entre la radiación ionizante aplicada y las modificaciones observadas en la composición química de los alimentos RTE seleccionados y que, además, el efecto es distinto dependiendo del tipo y la composición del alimento tratado. En general los tratamientos a dosis de radiación altas (6 y 8 kGy) provocan cambios significativos en la composición del alimento, mientras que las dosis bajas (1 y 2 kGy) no presentan efectos adversos en los parámetros composicionales considerados. La aplicación de herramientas quimiométricas hace posible por tanto establecer o predecir las alteraciones en el alimento a distintas dosis de radiación, identificar las causas de dichos cambios y relacionarlos entre si.

Como conclusión final cabe destacar que con el presente trabajo se han desarrollado diversas metodologías para la determinación quiral tanto de herbicidas ariloxifenoxipropiónicos y aminoácidos en muestras complejas basadas en la cromatografía quiral directa y en los acomplamientos cromatográficos de tipo HPLC aquiral-HPLC quiral. Además, se ha evaluado el potencial de técnicas como la cLC-MS en el análisis de analitos en bajas concentraciones en matrices complejas, resultando

una alternativa eficaz a los métodos tradicionales de HPLC que posibilitan, además de un consumo mínimo de disolventes, una generación mínima de residuos.

Parte del trabajo recogido en esta Memoria ha dado lugar a varias publicaciones (anexos I-V) y comunicaciones a congresos internacionales (anexo VI).



Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien, *"Química Agrícola II. Plaguicidas y fitorreguladores"*. Editorial Alambra (1ª Ed), Madrid (**1977**) 455.
- (2) R.L. Zimdahl, *"Fundamentals of Weed Science"*. Elsevier Inc (3ª Ed), Londres (**2007**) 359.
- (3) R. Labrada, J.C. Caseley, C. Parker, *"Manejo de malezas para países en desarrollo"*. Depósito de documentos de la FAO (1ª Ed), Roma (**1996**) cap. 10.
- (4) A. Ghafoor, N.J. Jarvis, T. Thierfelder, J. Stenström, *Sci. Total Environ.*, 409 (**2011**) 1900.
- (5) X. Domenech, *"Química Ambiental"*. Miraguano Ediciones (2ª Ed), Madrid (**1997**) 48.
- (6) D. Gómez de Barreda Feraz, A. Gamon, A. Sáez, *"Características Físicoquímicas y Biológicas que definen el Comportamiento de los Fitosanitarios"*. SEMh-Ediciones y Promociones LAV S.L. (1ª Ed), Valencia (**1998**) 98.
- (7) T.J. Monaco, S.C. Weller, F.M. Ashtonm, *"Weed Science: Principles and Practices"*. John Wiley & Sons Inc (4ª Ed), Canada (**2002**) 194.
- (8) Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, *"Registro de Productos Fitosanitario"*. Documento en red (<http://www.marm.es>), activo en enero de **2012**.
- (9) J. Davies, *Pestic. Outlook.*, 12 (**2001**) 10.
- (10) J. Kanasazawa, *Environ. Toxicol. Chem.*, 8 (**1989**) 477.
- (11) S.S. Prasad, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 75 (**1992**) 916.
- (12) C.D.S. Tomlin, *"The Pesticide Manual"*. Ed. British Cop Protection Council (11th Ed), Londres (**1997**).
- (13) W.H. Ahrens, *"Herbicide Handbook"*. Ed. Weed Science Society of America (7th Ed), Illinois (**1994**).
- (14) Environmental Protection Agency, *"Diclofop-methyl. Environmetal fate and effects assessment"*. Documento en red (www.epa.gov) activo en enero de **2012**.
- (15) J. Dekker, *"Herbicide Inhibitors of Fatty Acid Synthesis and Elongation"*. Plant and Soil Sciences eLibrary. Documento en red ([www. plantandsoil.unl.edu](http://www.plantandsoil.unl.edu)) activo en enero de **2012**.

- (16) R.A. Larson, E.J. Weber, "*Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*". CRC Press (1ª Ed), Boca Raton (**1994**).
- (17) R.P. Scharzenbach, P.M. Gschwend, D.M. Imboden, "*Environmental Organic Chemistry*". Ed. Wiley-Interscience (2nd Ed), Hoboken, New Jersey (**2003**).
- (18) I.D. Palut, J.K. Ludwick, G. Kostka, J. Kopec'-Szeleza, B. Wiadrowska, K. Lembowic, *Toxicol.*, 158 (**2001**) 119.
- (19) G. Kostka, D. Palut, J. K. Ludwick, J. Kopec'-Szeleza, B. Wiadrowska, K. Lembowic, *Toxicol.*, 178 (**2002**) 221.
- (20) R. Cabrera Bonet, A. Paños Rosillo, M.C. Megía Morales, "*Manual Toxicológico de Productos fitosanitarios para uso sanitario*". Servicio de Información Toxicológico (1ª Ed), Instituto Nacional de Toxicología (**1998**) 89.
- (21) J.R. Reigart, J.R. Roberts, "*Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas*". Environmental Protection Agency. Documento en red (www.epa.gov) activo en enero **2012**.
- (22) World Health Organization, "*The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*". WHO. Documento en red (www.who.int) activo en enero de **2012**.
- (23) Comisión Europea de Medioambiente, "*Directive 76/464/EEC, Water pollution by discharges of certain dangerous substances*". Documento en red (www.ec.europa.eu) activo en enero de **2012**.
- (24) Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, "*Limites máximos de residuos de productos fitosanitarios Edición 2.6 (03/05/04)*". Documento en red (<http://www.marm.es>) activo en enero de **2012**.
- (25) "*Productos vegetales. Límites máximos y control de los residuos de plaguicidas*"; Ministerio de la Presidencia R. D 280/1994. B.O.E nº58, 2004 (**1994**). Trasposición de las directivas 90/642/CEE; 93/57/CEE; 93/58/CEE y 79/700/CEE.
- (26) Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos, "*Index to Pesticide Chemical Names Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Chemical Name)*", Oficina de programas de pesticidas (**2009**).
- (27) G.C Ibarrett, D.T Elmore, "*Amino Acids and Peptides*". Cambridge University Press (2ª Ed), Reino Unido (**2004**) 1.
- (28) A.L. Lehninger, M. Cox, D.L. Nelson, "*Principios de Bioquímica*". Ed.Omega (4º Ed), Barcelona (**2008**) 59.
- (29) L. Stryer, "*Bioquímica*". Editorial Reverté (4º Ed), Barcelona (**2001**) 25.
- (30) A.G. Petsko, "*Protein structure and function*". Sinauer associates (1st Ed) USA (**2004**) 1.

- (31) P.J. Reeds, *J. Nutr.*, 130 (2000) 1835S.
- (32) P.Füst, P. Stehle, *J. Nutr.*, 134 (2004) 1558S.
- (33) M.K. Campbell, S.O. Farrell, "Biochemistry". Thomson Brookes Cole (6ª Ed), Estados Unidos (2007) cap. 23.
- (34) M.C. Latham, "*Nutrición humana en el mundo en desarrollo*". Depósito de documentos de la FAO: Alimentación y nutrición N° 29 (1ªEd), Roma (2002) cap. 9, 17.
- (35) R.A. Kilani, F.S., D.M. Cole Bier, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61 (1995) 1218.
- (36) R. Bross, R.O. Ball, J.T. Clarke, P.B. Pencharz, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 278 (2000) E195.
- (37) E.C. Henley, J.R.N. Taylor, S.D. Obukosia, *Adv. Food Nutr. Res.*, 60 (2010) 21.
- (38) O. Martínez Agustín, E. Martínez de Victoria Muñoz, *Nutr. Hosp.*, 21 (2006) 1.
- (39) H. J. Cleaves, *J. Theor. Biol.*, 263 (2010) 490.
- (40) L.L. Hu, S. Niu, T. Huang, K. Wang, X.H. Shi, Y.D. Cai, *PLoS One*, 5 (2010) e15917.
- (41) M.J.O'Neil, "*The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*". Wiley John & Sons (14th Ed), Canadá (2006).
- (42) W.M. Haynes, D.R.Lide, "*CRC Handbook of Chemistry and Physics*". CRC Press, Taylor & Francis Group (91st Ed Internet version), Estados Unidos (2011).
- (43) E. Buxbaum, "*Fundamentals of protein structure and function*". Springer (1º Ed) Nueva York, (2007).
- (44) G.C Ibarrett, D.T Elmore, "*Amino Acids and Peptides*". Cambridge University Press (2ª Ed), Reino Unido (2004) 1.
- (45) A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, "*Handbook of Metalloproteins*". John Wiley & Sons (1ºEd), Chichester (2001) vol. 1.
- (46) Y. Inokuchi, Y. Kobayashi, T. Ito, T. Ebata, *J. Phys. Chem. A.*, 111 (2007) 3209.
- (47) S.C. Moldoveanu, *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, 28 (2010) 527.
- (48) J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, "*Organic Chemistry*". Oxford University Press (1º Ed.), Estados Unidos (2000) cap. 51.
- (49) C.B. Ammerman, D.H. Baker, A.J. Lewis, " *Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, vitamins*". Academic Press (1º Ed), Reino unido (1995) cap. 2.
- (50) S.S. Oja, A. Schousboe, P. Saransaari, " *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System*". Springer-Verlag (3º Ed.), Berlin (2007) cap. 4.
- (51) J.D. Fernstrom, M.H. Fernstrom, *J. Nutr.*, 137 (2007) 1539S.

- (52) W.F. Byerley, L.L. Judd, F.W. Reimherr, B.I. Grosser, *J. Clin. Psychopharmacol.*, 7 (1987) 127.
- (53) G.V. Carra, I. Lucki, *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 21 (2010) 493.
- (54) C.P. Magalhães, M.F.L. de Freitas, M.I. Nogueira, R.C de Farias Campina, L.F. Takase, S.L. de Souza, R.M. de Castro, *Nutr. Neurosci.*, 13 (2010) 246.
- (55) D. Baldwin, P. Cosford, *Psychiatric Bulletin* 15 (1991) 222.
- (56) L.E. Fellows, E.A. Bell, *Phytochem.*, 9 (1970) 2389.
- (57) Registro en línea de productos. Laboratorios Lamberts Española S.L. Documento en red (www.lamberts.es) activo en enero de 2012.
- (58) N. Lovieno, E.D. Dalton, M. Fava, D. Mischoulon, *J. Affect. Disord.*, 130 (2011) 347.
- (59) M.J. Crockett, L. Clark, G. Tabibnia, M.D. Lieberman, T.W. Robbins, *Science*, 320 (2008) 1739.
- (60) K. Bruinsma, D.L. Taren, *J. Am. Diet. Assoc.*, 99 (1999) 1249.
- (61) T. Herraiz, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4900.
- (62) D.H. Alpers, W.F. Stenson, D.M. Bier, "Nutrición". Marbán (4º Ed), Madrid (2003).
- (63) O.R. Fennema, "Química de los alimentos". Acribia Editorial (2º Ed), Zaragoza (2000) cap. 5.
- (64) S.B. Dergal, "Química de los alimentos". Editorial Pearson (4º Ed), España (2006) cap 3.
- (65) L.S. Jackson, W.A. Hargraves, *J. Agric. Food Chem.*, 43 (1995) 1678.
- (66) D. Dimitrellou, P. Kandyli, A. Mallouchos, M. Komaitis, A.A. Koutinas, Y. Kourkoutas, *Food Chem.*, 119 (2010) 795.
- (67) N.P. Mangia; M.A. Murgia; G. Garau, M.G. Sanna, P. Deiana; *Food Microbiol.*, 25 (2008) 366.
- (68) E. Simova, Z. Simov, D. Beshkova, G. Frengova, Z. Dimitrov, Z. Spasov, *Int. J. Food Microbiol.*, 107 (2006) 112.
- (69) C. Bertrand-Harb, I.V. Ivanova, M. Dalgalarrodo, T. Haertl, *Int. Dairy J.*, 13 (2003) 39.
- (70) E.C. Pappa, K. Sotirakoglou, *Food Chem.*, 111 (2008) 606.
- (71) A. Picon, P. Gaya, E. Fernández-García, A. Rivas-Cañedo, M. Ávila, M. Nuñez, *J. Dairy Sci.*, 93 (2010) 2896.
- (72) M. Stenberg, G. Marko-Varga, R. Öste, *Food Chem.*, 79 (2002) 507.
- (73) G. Ravindran, W.L. Bryden, *Food Chem.*, 89 (2005) 309.
- (74) B. Loukili, C. Dufresne, E. Jourdan, C. Grosset, A. Ravel, *J. Chromatogr. A*, 986 (2003) 45.

- (75) W. Lang, J.A. Masucci, G.W. Caldwell, W. Hageman, J. Hall, W.J. Jones, B.M. Rafferty, *Anal. Biochem.*, 333 (2004) 79.
- (76) Á. Korös, Z. Varga, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A*, 1203 (2008) 146.
- (77) M. Gil-Díaz, M.J. Santos-Delgado, S. Rubio-Barroso, L.M. Polo-Díez, *Meat Sci.*, 82 (2009) 24.
- (78) J.A. Ordóñez, M.I. Cambero, L. Fernández, M.L. García, G. García de Fernando, L. de la Hoz, M.D. Selgas, *"Tecnología de los Alimentos. Vol. I. Componentes de los Alimentos y Procesos"*. Editorial Síntesis (1º Ed), Madrid (1998).
- (79) J.G. Brennan, *"Manual del procesado de los alimentos"*. Acribia Editorial (1º Ed), Zaragoza (2008).
- (80) L. Hultmann, A.M. Rora, I. Steinsland, T. Skara, T. Rustad, *Food Chem.*, 85 (2004) 377.
- (81) Z. Usydus, J. Szlinder-Richert, M. Adamczyk, *Food Chem.*, 112 (2009) 139.
- (82) R. Virgili, G. Sacconi, L. Gabba, E. Tanzi, C. Soresi Bordini, *Food Sci. Technol.*, 40 (2007) 871.
- (83) M. Prevolnik, M. Skrlep, L. Janes, S. Velikonja-Bolta, D. Skorjanc, M. Candek-Potokar, *Meat Sci.*, 88 (2011) 299.
- (84) M. Martuscelli, P. Pittia, L.M. Casamassima, A.C. Manetta, L. Lupieri, L. Neri, *Food Chem.*, 116 (2009) 955.
- (85) T. Pérez-Palacios, J. Ruiz, J. M. Barat, M. C. Aristoy, T. Antequera, *Meat Sci.*, 85 (2010) 121.
- (86) A. Montañó, F.J. Casado, A. de Castro, A.H. Sánchez, L. Rejano, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 7324.
- (87) C. Ruiz-Capillas, A. Moral, *Food Chem.*, 86 (2004) 85.
- (88) C.P. del Campo, T. Garde-Cerdán, A.M. Sánchez, L. Maggi, M. Carmona, G.L. Alonso, *Food Chem.*, 114 (2009) 1542.
- (89) B. Marcos Muntal, "Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes". Colección de Tesis Doctorales, Universidad de Gerona, (2007).
- (90) T. Ross, M. Smith, *"Exposure assessment of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat foods"*. Depósito de documentos de la FAO&WHO, Roma (2000).
- (91) I. Walls, R.L. Buchanan, *Food Control*, 16 (2005) 795.
- (92) E.C.D. Todda, S. Notermans, *Food Control*, 22 (2011) 1484.

- (93) “Guía simplificada para el entendimiento y uso de Objetivos de Inocuidad de los Alimentos y Objetivos de Rendimiento”. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF), (2006).
- (94) M. Restrepo Gallego, “*Producción más Limpia en la Industria Alimentaria*”, *Producción + Limpia*, 1 (2006) 87.
- (95) M. Raventós Santamaría, “*Industria alimentaria. Tecnologías emergentes*”, Ediciones de la Universidad Politécnica de Catalunya (1º Ed.) Barcelona (2005).
- (96) P. Morales, J. Calzada, M. Nuñez, *J. Food Protect.*, 69 (2006) 2539.
- (97) A. Lasagabaster, J.C. Arbolea, I. Martínez de Marañón, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 12 (2011) 124.
- (98) V.M. Gómez-López, P. Ragaert, J. Debevere, F. Devlieghere, *Trends Food Sci. Tech.*, 18 (2007) 464.
- (99) I.M. Caminiti, I. Palgan, F. Noci, A. Muñoz, P. Whyte, D.A. Cronin, D.J. Morgan, J. G. Lyng, *Innovat Food Sci Emerg Tech.*, 12 (2011) 118.
- (100) J.A. Ordóñez Pereda, M. Juárez Iglesias, G. Zurera Cosano, A. Otero Carballeira “*Aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos*”. Documento del Comité científico de la AESA (Núm. Referencia: AESA-2003-004) (2004).
- (101) C.H. Sommers, X. Fan, “*Food Irradiation. Research and Technology*”, IFT Press (1º Ed), Oxford (2006).
- (102) R.A. Molins, “*Food Irradiation: Principles And Applications*”. John Wiley & Sons (1º Ed), Nueva York (2001).
- (103) Ministerio de Sanidad y Consumo, “*Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes*”. Documento en red (<http://noticias.juridicas.com/>) activo en enero de 2012.
- (104) J. Scott Smith, S. Pillai, *Food Technol.*, 58 (2004) 48.
- (105) Decisión de la Comisión Europea del 4 de Enero de 2007 y Decisión de la Comisión Europea del 22 de Marzo de 2010 que modifican a “*Decision 2002/840/EC as regards the list of approved facilities in third countries for the irradiation of foods*”. Documento en red (www.eur-lex.europa.eu) activo en enero de 2012.
- (106) Food and Drug Administration (FDA), “*Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods*”. Washington (2001).
- (107) I. Walls, *Meat Sci.*, 74 (2006) 66.

- (108) N. Rosales-Conrado, M.E León-González, L.V Pérez-Arribas, L.M Polo-Díez, *Anal. Bioanl. Chem.*, 391 **(2008)** 1433.
- (109) M.C. Cabeza, I. Cambero, L. de la Hoz, J.A. Ordóñez, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 8 **(2007)** 299.
- (110) T.A. Houser, J.G. Sebranek, S.M. Lonergan, *J. Food Sci.*, 68 **(2003)** 2362.
- (111) A. Carrasco, R. Tárrega, M.R. Ramírez, F.J. Mingoarranz, R. Cava, *Meat Sci.*, 69 **(2005)** 609.
- (112) V. Guillén-Casla, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *Anal. Bioanl. Chem.*, 397 **(2010)** 63.
- (113) V. Guillén-Casla, N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *J. Food Compos. Anal.*, 24 **(2011)** 456.
- (114) M.C. Cabeza, L. de la Hoz, R. Velasco, M.I. Cambero, J.A. Ordóñez, *Meat Sci.*, 83 **(2009)** 320.
- (115) C. Barba, M.M. Calvo, M. Herraiz, G. Santa-María, *Food Chem.*, 114 **(2009)** 1517.
- (116) I. Galán, M.L. García, M.D. Selgas, *Meat Sci.*, 87 **(2011)** 330.
- (117) R. Gonzalo-Lumbreras, N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *J Chromatogr A.*, 1217 **(2010)** 6778.
- (118) B.S. Songa, J.G. Parka, J.N. Parka, I.J. Hana, J.H. Kima, J.I. Choia, M.W. Byuna, J.W. Lee, *Adv. Spa. Res.*, 44 **(2009)** 162.
- (119) J.W. Lee, K.S. Park, J.G. Kim, S.H. Oh, Y.S. Lee, J.H. Kim, M.W. Byun, *Radiat. Phys. Chem.*, 72 **(2005)** 49.
- (120) C. Gomes, R.G. Moreira, M.E. Castell-Perez, J. Kim, P. da Silva, A. Castillo, *J. Food Sci.*, 73 **(2008)** E95.
- (121) M.J. Zhu, A. Mendonca, B. Min, E.J. Lee, K.C. Nam, K. Park, M. Du, H.A. Ismail, D.U. Ahn, *Food Sci.*, 69 **(2004)** C382.
- (122) R. Velasco, J.A. Ordóñez, M.C. Cabeza, L. de la Hoz, M.I. Cambero, *Int. Dairy J.*, 21 **(2011)** 493.
- (123) D.J.S. Findlay, T.V. Parsons, M.R. Sene, *Int. J. Radiat. Appl.*, 43 **(1992)** 567.
- (124) N. Benkeblia, S. Onodera, N. Shiomi, *Food Chem.*, 87 **(2004)** 377.
- (125) M.W. Byun, H.S. Yook, O.J. Kwon, I.J. Kwang, *Radiat. Phys. Chem.*, 49 **(1997)** 483.
- (126) C. Krach, G. Sontag, S. Solar, *Food Res. Int.*, 32 **(1999)** 43.
- (127) B. van Wickern, B. dt Müller, T. Simat, H. Steinhart, *J. Chromatogr. A.*, 786 **(1997)** 57.
- (128) K.K. Kleeberg, A. Müller, T.J. Simat, H. Steinhart, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 527 **(2003)** 677.

- (129) H. Matloubi, F. Aflaki, M. Hadjiezadegan, *J. Food Compos. Anal.*, 17 (2004) 133.
- (130) N. Erkan, Ö. Özden, *Radiat. Phys. Chem.*, 76 (2007) 1636.
- (131) C. Jo, D.U. Ahn, *J. Food Scie.*, 65 (2000) 612.
- (132) U. Lyhs, J. Björkroth, E. Hyytiä, H. Korkeala, *Int J. Food Microbiol.*, 45 (1998) 135.
- (133) G. Drabik-Markiewicz, B. Dejaegher, E. de Mey, S. Impens, T. Kowalska, H. Paelinck, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta*, 657 (2010) 123.
- (134) M. Sanz-Alaejos, J.H Ayala, V. González, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. B*, 862 (2008) 15.
- (135) M.S. Brewer, *Meat Sci.*, 81 (2009) 1.
- (136) S. Brewer, *Meat Sci.*, 68 (2004) 1.
- (137) M. Medina, M.C. Cabeza, D. Bravo, I. Cambero, R. Montiel, J.A. Ordoñez, M. Nuñez, L. Hoz, *Food Microbiol.*, 26 (2009) 224.
- (138) A. Guijarro, M. Yus, "The Origin of Chirality in the Molecules of Life A Revision from Awareness to the Current Theories and Perspectives of this Unsolved Problem". RCS Publishing (1º Ed), Cambridge (2009) cap. 1.
- (139) I. Asimov, "Breve historia de la química". Alianza Editorial (5º Ed), Madrid (2004) cap. 6.
- (140) I. Ali, H.Y. Aboul-Enein, "Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis". John Wiley and Sons (1º Ed), Chinchester (2004).
- (141) X. Gu, P. Wang, D. Liu, Y. Lu, Z. Zhou, *Pestic. Biochem. Phys.*, 92 (2008) 1.
- (142) R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, "Chiral environmental pollutants". Ed Springer (1º Ed), Berlin (1999) cap. 3.
- (143) X. Gu, P. Wang, D. Liu, Y. Lu, Z. Zhou, *Pestic. Biochem. Phys.*, 92 (2008) 1.
- (144) X. Gu, Y. Lu, P. Wang, Z. Dang, Z. Zhou, *Food Chem.*, 121 (2010) 264.
- (145) Y. Lu, Z. He, J. Diao, P. Xu, P. Wang, Z. Zhou, *Food Chem.*, Artículo en prensa (2011) doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.032.
- (146) X. Zhang, S. Wang, Y. Wang, T. Xia, J. Chen, X. Cai, *J. Hazard Mater.*, 186 (2011) 876.
- (147) G.W. Ware, D.M. Whitacre, "The Pesticide Book". Meister Media Worldwide (6º Ed), Ohio (2004) cap. 9.
- (148) K. Hamase, A. Morikawa, T. Ohgusu, W. Lindner, K. Zaitzu, *J. Chromatogr. A*, 1143 (2007) 105.
- (149) Y. Nagata, M. Higashi, I. Yutaka, S. Hiroaki, T. Minoru, T. Kumiko, T. Kazuma, U. Masahiro, *Life Sci.*, 78 (2006) 1677.

- (150) Z. Shulin, W. Bing, H. Min, B. Wenling, C. Li, *Anal. Chim. Acta*, 569 (2006) 182.
- (151) S. Casal, E. Mendes, M.B.P.P. Oliveira, M.P.Ferreira, *Food Chem.*, 89 (2005) 333.
- (152) J. Csapó, E. Varga-Visi, K. Lóki, C. Albert, S. Salamon, *Amino Acids*, 34 (2008) 287.
- (153) Y. Gogami, K. Okada, T. Oikawa, *J. Chromatogr. B*, Artículo en prensa (2011) doi:10.1016/j.jchromb.2011.04.006.
- (154) C. Guimont, *Int. Dairy J.*, 12 (2002) 729.
- (155) T. Erbe, H. Brückner, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 81.
- (156) H. Brückner, M. Langer, M. Lüpke, T. Westhauser, H. Godel, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 229.
- (157) C. Bertrand-Harb, I.V. Ivanova, M. Dalgalarondo, T. Haertl, *Int. Dairy J.*, 13 (2003) 39.
- (158) E. Simova, Z. Simov, D. Beshkova, G. Frengova, Z. Dimitrov, Z. Spasov, *Int. J. Food Microbiol.*, 107 (2006) 112.
- (159) M. D. G. Osthoff, B.C. Viljoen, A. Hugo, *Enzyme Microb. Tech.*, 37 (2005) 606.
- (160) N.P. Mangia, M.A. Murgia, G. Garau, M.G. Sanna, P. Deiana, *Food Microbiol.*, 25 (2008) 366.
- (161) D. Carlavilla, M.V. Moreno-Arribas, S. Fanali, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 27 (2006) 2551.
- (162) D. Jin, T. Miyahara; T. Oe, T. Toyooka; *Anal. Biochem.*, 269 (1999) 124.
- (163) G. D'Orazio, A. Cifuentes, S. Fanali, *Food Chem.*, 108 (2008) 1114.
- (164) C. Simó. A. Rizzi, C. Barbas, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1432.
- (165) R. Marcheli, A. Dossena, G. Palla, *Trends Food Sci. Tech.*, 7 (1996) 113.
- (166) A.Giuffrida, L.Tabera, R. González, V. Cucinotta, A.Cifuentes, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 243.
- (167) M. Mazzoncini, R. Lorenzi, R. Risaliti, C. Sorce, M. Ginanni, M. Curadi, R. Pini, *Soil Till. Res.*, 46 (1998) 241.
- (168) J.L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2010) 6767.
- (169) R.M. Callejón, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *Talanta*, 81 (2010) 1143.
- (170) A. Braithwaite, F. J. Smith, *"Chromatographic Methods"*. Kluwer Academic Publishers (5º Ed), Países Bajos (1996) cap. 1.
- (171) W. Liu, Z. Chen, H. Xu, Y. Shi, Y. Chen, *J. Chromatogr.*, 547 (1991) 209.
- (172) P. Fusi, M. Franci, M. Bosetto, *Appl. Clay Sci.*, 3 (1988) 63.
- (173) I. Baranowska, Matgorzata Kozłowska, *Talanta*, 42 (1995) 1553.

- (174) J. Hajslova, F. Pudil, Z. Jehlickova, I. Viden, J. Davidek, *J. Chromatogr.*, 438 (1988) 5560.
- (175) S. Butz, H.J. Stan, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 227.
- (176) R. Carabias-Martínez, C. García-Hermida, E. Rodríguez-Gonzalo, F.E. Soriano-Bravo, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A*, 1002 (2003) 1.
- (177) A. Gelsomino, B. Petroviowi, S. Tiburtini, E. Magnani, M. Felici, *J. Chromatogr. A*, 782 (1997) 105.
- (178) N. Sauret-Szczepanski, P. Mirabel, H. Wortham, *Environ. Pollut.*, 139 (2006) 133.
- (179) C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, 1131 (2006) 11.
- (180) T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee, *Anal. Chim. Acta*, 619 (2008) 67.
- (181) S.R. Rissato, M.S. Galhiane, F.R.N. Knoll, B.M. Apon, *J. Chromatogr. A*, 1048 (2006) 153.
- (182) X.G. Chua, X.Z. Hu, H.Y. Yao, *J. Chromatogr. A*, 1063 (2005) 201.
- (183) T.D. Nguyen, K.J. Lee, M.H. Lee, G.H. Lee, *Microchem. J.*, 95 (2010) 43.
- (184) Y. Wang, H.Y. Jin, S.C. Ma, J. Lu, R.C. Lin, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 334.
- (185) F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, J. Ruiz-García, R. Bermúdez-Peinado, O. Ballesteros, A. Navalon, J.L. Vilchez, *J. Food Compos. Anal.*, 24 (2011) 427.
- (186) C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, 1125 (2006) 244.
- (187) M.I. Catalina, J. Dalluge, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 877 (2000) 153.
- (188) G.F. Pang, Y.Z. Cao, J.J. Zhang, C.L. Fan, Y.M. Liu, X.M. Li, G.Q. Jia, Z.Y. Li, Y.Q. Shi, Y.P. Wu, T.T. Guo, *J. Chromatogr. A*, 1125 (2006) 1.
- (189) C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, 1125 (2006) 244.
- (190) A. Li, T. Imasaka, T. Uchimura, T. Imasaka, *Anal. Chim. Acta*, 701 (2011) 52.
- (191) C. Feidt, A. Petit, F. Bruas-Reignier, J. Brun-Bellut, *Meat Sci.*, 44 (1996) 19.
- (192) M.J. Nozal, J.L. Bernal, M.L. Toribio, J.C. Diego, A. Ruiz, *J. Chromatogr. A*, 1047 (2004) 137.
- (193) T. Mohabbat, B. Drew, *J. Chromatogr. B*, 862 (2008) 86.
- (194) P. Husek, P. Simek, P. Hartvich, H. Zahradnickova, *J. Chromatogr. A*, 1186 (2008) 391.
- (195) Y.C. Fiamegos, C.G. Nanos, C.D. Stalikas, *J. Chromatogr. B*, 813 (2004) 89.

- (196) P. Huseka, P. Matucha, A. Vrankova, P. Simek, *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 311.
- (197) A.A.B. Badawy, C.J. Morgan, J.A. Turner, *Amino Acids*, 34 (2008) 587.
- (198) W.P. Chen, X.Y. Yang, A.D. Hegeman, W.M. Gray, J.D. Cohen, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 2199.
- (199) M. Mandalakis, M. Apostolaki, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 143.
- (200) G.L. Sasaki, L.M. Souza, R.V. Serrato, T.R. Cipriani, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 215.
- (201) E.A. McGaw, K.W. Phinney, M.S. Lowenthal, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5822.
- (202) J.L. Bernal, M.J. Nozal, L. Toribio, C. Diego, R. Mayo, R. Maestre, *J. Chromatogr. A*, 1192 (2008) 266.
- (203) X. Shen, C. Deng, B. Wang, L. Dong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2008) 931.
- (204) A. Namera, M. Yashiki, M. Nishida, T. Kojima, *J. Chromatogr. B*, 776 (2002) 49.
- (205) B.M. Silva, S. Casal, P.B. Andrade, R.M. Seabra, M.B. Oliveira, M.A. Ferreira, *Anal. Sci.*, 19 (2003) 1285.
- (206) J. Lee, J.M. Harnly, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 9100.
- (207) L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *"Introduction To Modern Liquid Chromatography"*. John Wiley & Sons (3^o Ed), Chichester (2010).
- (208) L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *"Practical HPLC Method Development"*. John Wiley & Sons (2^o Ed), Nueva York (1997).
- (209) D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1069.
- (210) J. García-Lavandeira, P. Oliveri, J.A. Martínez-Pontvedra, M.H. Bollaín, M. Forina, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 1951.
- (211) P. Jandera, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2011) 1.
- (212) L. Trojer, C.P. Bisjak, W. Wieder, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6303.
- (213) J.M. Cunliffe, T.D. Maloney, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 3104.
- (214) J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 1.
- (215) T. Takeuchi, *Chromatography*, 26 (2005) 7.
- (216) N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 114.
- (217) S. Armenta, B. Lendl, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 297.
- (218) M. Sandvoss, A.D. Roberts, I.M. Ismail, S.E. North, *J. Chromatogr. A*, 1028 (2004) 259.

- (219) G. Quintás, J. Kuligowski, B. Lendl, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 3746.
- (220) A. Prüß, C. Kempter, T. Jira, J. Gysler, *J. Chromatogr. A*, 1016 (2003) 129.
- (221) A. Prüß, C. Kempter, J. Gysler, T. Jira, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 167.
- (222) N. Wu, J.A. Lippert, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A*, 911 (2001) 1.
- (223) T. Takeuchi, S. Tatsumi, S. Masuoka, K. Hirose, H. Uzu, J.Y. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K.P. Lee, J.J. Ryoo, S.H. Choi, *J. Chromatogr. A*, 1021 (2003) 55.
- (224) S. Fanali, P. Catarcini, C. Presutti, R. Stancanelli, M.G. Quagli, *J. Chromatogr. A*, 990 (2003) 143.
- (225) M.E. León-González, N. Rosales-Conrado, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 7507.
- (226) N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *Anal Chim Acta.*, 470 (2002) 147.
- (227) R.E. Ardrey, *"Liquid Chromatography– Mass Spectrometry: An Introduction"*. John Wiley & Sons Ltd (1^a Ed), Inglaterra (2003).
- (228) Ionization Theory Application Notes. Agilent Technologies. Documento en red (www.chem.agilent.com) activo en enero de 2012.
- (229) K.Tang, J.S. Page, R.T. Kelly, I. Marginean *"Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry"*. Elsevier Ltd (2nd Ed) (2010).
- (230) J. Zrostlíková, J. Hajslová, J. Poustka, P. Begany, *J. Chromatogr. A*, 973 (2002) 13.
- (231) A. Lagana, G. Fago, A. Marino, *J. Chromatogr. A*, 796 (1998) 309.
- (232) G. D'Ascenzo, A. Gentili, S. Marchese, D. Perret, *J. Chromatogr. A*, 813 (1998) 285.
- (233) J.M. Bermúdez-Saldaña, L. Escuder-Gilabert, M.J. Medina-Hernández, R. M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, *J. Chromatogr. B*, 814 (2005) 115.
- (234) F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A*, 1109 (2006) 242.
- (235) R. Curini, A. Gentili, S. Marchese, A. Marino, D. Perret, *J. Chromatogr. A*, 874 (2000) 187.
- (236) R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Talanta*, 76 (2008) 211.
- (237) C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A*, 1131 (2006) 11.
- (238) R. Roehrs, R. Zanella, I. Pizzuti, M.B. Adaime, L. Pareja, S. Niell, M.V. Cesio, H. Heinzen, *J. of AOAC Inter.*, 92 (2009) 1190.
- (239) J. Wang, D. Leung, *J. of AOAC Inter.*, 92 (2009) 279.

- (240) M. Mezcua, O. Malato, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 913.
- (241) L. Song, R. Hua, Y. Zhao, *J. Hazard Mater.*, B118 (2005) 247.
- (242) A. Laganà, G. Fago, A. Marino, V.M. Penazzi, *Anal. Chim. Acta.*, 415 (2000) 41.
- (243) G. Özhan, S. Öden, B. Alpertunga, *J. Environ. Sci. Health B.*, 40 (2005) 827
- (244) M. Asensio-Ramos, G. D'Orazio, J. Hernandez-Borges, A. Rocco, S. Fanali, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 1113.
- (245) O. Lacina, J. Urbanova, J. Poustka, J. Hajslova, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 648.
- (246) P. Plaza Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 16.
- (247) G. Chen, P. Cao, R. Liu, *Food Chem.*, 125 (2011) 1407.
- (248) B. Mayer-Helm, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2009) 8953.
- (249) A. Lazartigues, C. Fratta, R. Baudot, L. Wiest, C. Feidt, M. Thomas, C. Cren-Olivé, *Talanta*, 85 (2011) 1500.
- (250) A. Lagana, G. Fago, A. Marino, M. Mosso, *Anal. Chim. Acta.*, 375 (1998) 107.
- (251) R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, O.D. Prestes, S.L. Grió, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1477.
- (252) R. Freitag, *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 267.
- (253) H. Katae, S. Hirashima, A. Harata, *J. of Physics: Conference Series*, 214 (2010) 012122.
- (254) S. Schiesel, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2011) 1655.
- (255) M. Kato, H. Kato, S. Eyama, A. Takatsu, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 3059.
- (256) R. Zangrando, R. Piazza, W.R.L. Cairns, F.C. Izzo, A. Vianello, E. Zendri, A. Gambaro, *Anal. Chim. Acta.*, 675 (2010) 1.
- (257) Y. Li, A.G. Tang, S. Mu, *Anal. Chim. Acta.*, 412 (2011) 1032.
- (258) R. Kand'ar, P. Zakova', J. Jirosova', M. Sladka, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 47 (2009) 565.
- (259) I. Kabelová, M. Dvoraková, H. Cizková, P. Dostalek, K. Melzoch, *J. Food Compos. Anal.*, 21 (2008) 736.
- (260) L. Wang, R. Xu, B. Hu, W. Li, Y. Sun, Y. Tu, X. Zeng, *Food Chem.*, 123 (2010) 1259.
- (261) V. Pereira, M. Pontes, J.S. Camara, J.C. Marques, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 435.
- (262) W. Liming, Z. Jinhui, X. Xiaofeng, L. Yi, Z. Jing, *J. Food Compos. Anal.*, 22 (2009) 242.

- (263) S. Hou, H. He, W. Zhang, H. Xie, X. Zhang, *Talanta*, 80 (2009) 40.
- (264) C. Arroyo, G. Cebrián, R. Pagán, S. Condón, *Int. J. Food Microbiol.*, 144 (2011) 446.
- (265) S. Özcan, H. Z. Senyuva, *J. Chromatogr. A*, 1135 (2006) 179.
- (266) T.J. Hsieh, S. Chen, *Amino Acids*, 33 (2007) 123.
- (267) Y. Song, T. Funatsu, M. Tsunod, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 335.
- (268) P. Kubán, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 1128 (2006) 97.
- (269) G. Koppiseti, A. Siriki, K. Sukala, G.V. Subbaraju, *Anal. Chim. Acta.*, 549 (2005) 129.
- (270) A.C.C.L. Martins, M.B.A. Gloria, *Food Chem.*, 118 (2010) 529.
- (271) N. Kato, T. Kojima, S. Yoshiyagawa, H. Ohta, A. Toriba, H. Nishimura, K. Hayakawa, *J. Chromatogr. A*, 1145 (2007) 229.
- (272) X. Huang, G. Mazza, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3890.
- (273) A. Bertazzo, S. Comai, I. Brunato, M. Zancato, C.V.L. Costa, *Food Chem.*, 124 (2011) 93.
- (274) K. Gregersen, L. Froyland, A. Berstad, P. Araujo, *Talanta*, 75 (2008) 466.
- (275) P. Uutela, R. Reinila, K. Harju, P. Piepponen, R.A. Ketola, R. Kostinen, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 8417.
- (276) P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparò, S. Cavalli, G. Saccani, *J. Chromatogr. A*, 1129 (2006) 67.
- (277) P.J. Monaghan, H.A. Brown, L.A. Houghton, B.G. Keevil, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 2163.
- (278) J. Cao, S.J. Murch, R. O'Brien, P.K. Saxen, *J. Chromatogr. A*, 1134 (2006) 333.
- (279) K.V. Penmetsa, R.B. Leidy, D. Shea, *J. Chromatogr. A*, 790 (1997) 225.
- (280) J. He, A.P. Cheung, E. Struble, E. Wang, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 583.
- (281) F. Menzinger, Ph. Schmitt-Kopplin, D. Freitag, A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 45.
- (282) A. Messina, M. Flieger, F. Bachechi, M. Sinibaldi, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 69.
- (283) C. Desiderio, F. Iavarone, D.V. Rossetti, I. Messana, M. Castagnola, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 2385.
- (284) V.J. Moya, M. Flores, M.C. Aristoy, F. Toldrá, *Meat Sci.*, 58 (2001) 197.
- (285) C.M. Ciriacks, M.T. Bowser, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6582.
- (286) S. Zhao, B. Wang, M. He, W. Bai, L. Chen, *Anal. Chim. Acta.*, 569 (2006) 123.
- (287) M. Wakayama, N. Aoki, H. Sasaki, R. Ohsugi, *Anal. Chem.*, 15 (2010) 9967.
- (288) Z.D. Peterson, M.L. Lee, S.W. Graves, *J. Chromatogr. B*, 810 (2004) 101.

- (289) S. Viglio, M. Fumagalli, F. Ferrari, P. Iadarola, *Electrophoresis*, 31 (2010) 93.
- (290) D. Carlavilla, M.V. Moreno-Arribas, S. Fanali, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 27 (2007) 2551.
- (291) T. Harner, K. Wiberg, A. Norstrom, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 218.
- (292) H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, "Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies". Marcel Dekker Inc. (1° Ed), Nueva York (2003).
- (293) A. Péter, R. Török, K. Wright, M. Wakselman, J.P. Mazaleyrat, *J. Chromatogr. A*, 1021 (2003) 1.
- (294) I. Ilisz, R. Berkecz, A. Peter, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 47 (2008) 1.
- (295) N.R. Srinivas, *Biomed. Chromatogr.*, 48 (2004) 343.
- (296) H. Hühnerfuss, M.R Shah, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 481.
- (297) S. Rubio-Barroso; M.J. Santos-Delgado; L.M. Polo-Díez, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 31 (2008) 2851.
- (298) S. Rubio-Barroso, M.J. Santos-Delgado, C. Martín-Oliver, L.M. Polo-Díez, *J. Dairy Sci.*, 89 (2006) 82.
- (299) A. D'aniello, M.M. di Fiore, G.H. Fisher, A. Milone, A. Seleni, L.S. D'aniello, A.F. Perna, D. Ingrosso, *The FASEB J.*, 14 (2000) 699.
- (300) S. Hess, K.R. Gustafson, D.J. Milanowski, E. Alvira, M.A. Lipton, L.K. Pannell, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 211.
- (301) G. Fisher, N. Lorenzo, H. Abe, E. Fujita, W.H. Frey, C. Emory, M.M. di Fiore, A. D'Aniello, *Amino Acids*, 15 (1998) 263.
- (302) J. Csapó, E. Varga-Visi, K. Lóki, C. Albert, *Chromatographia*, 63 (2006) S101.
- (303) O.P. Kleidernigg, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 251.
- (304) Y. Nagata, M. Higashi, Y. Ishii, H. Sano, M. Tanigawa, K. Nagata, K. Noguchi, M. Urade, *Life Sci.*, 78 (2006) 1677.
- (305) R. Bhushan, R. Kumar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 1697.
- (306) T. E. Beesley, R. P.W. Scott, "Chiral Chromatography". John Wiley and Sons (1° Ed), Chichester (1998).
- (307) P. Franco, T. Zhang, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 48.
- (308) G. Gübitz, M.G. Schmid, "Chiral Separations. Methods and Protocols". Humana Press (1° Ed), Nueva Jersey (2004).
- (309) A. Kostova, H.J. Bart, *Sep. Purif. Technol.*, 54 (2007) 340.
- (310) J. Haginaka, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 12.
- (311) R. Mallik, H. Xuan, D.S. Hage, *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 294.
- (312) G. Félix, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 27 (2004) 237.
- (313) D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, L.R. Chen, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1473.

- (314) T.J. Ward, A.B. Farris, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 73.
- (315) CHIROBIOTIC Method Development Kit. Supelco Analytical. Documento en red (<http://www.sigmaaldrich.com>) activo en enero de 2012.
- (316) M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 814.
- (317) G.S. Davy, P.D. Francis, *J. Chromatogr.*, 394 (1987) 323.
- (318) P. Padiglione, C.M. Polcaro, S. Marchese, M. Sinibaldi, M. Flieger, *J. Chromatogr. A*, 756 (1996) 119.
- (319) K. Weber, R. Kreuzig, M. Babadir, *Chemosphere*, 35 (1997) 13.
- (320) P. Wang, D. Liu, S. Jiang, Y. Xu, X. Gu, Z. Zhou, *Chirality*, 20 (2008) 40.
- (321) M.M. Mojtahedi, S. Chalavi, A. Ghassempour, K. Tabar-Heydar, S.J.G. Sharif, M. Malekzadeh, H.Y. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.*, 21 (2007) 234.
- (322) P. Chunxiu, S. Baochun, Z. Xuejun, Z. Datong, X. Xiuzhu, *Chin. J. Anal. Chem.*, 34 (2006) 159.
- (323) A. Messina, M. Flieger, F. Bachechi, M. Sinibaldi, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 69.
- (324) Q. Tian, C. Lv, P. Wang, L. Ren, J. Qiu, L. Li, Z. Zhou, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 310.
- (325) Z.Q. Zhou, P. Wang, S.R. Jiang, M. Wang, L. Yang, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 26 (2003) 2873.
- (326) Y. Ma, C. Xu, Y. Wen, W. Liu, *Chirality*, 21 (2009) 480.
- (327) V. Guillén-Casla, L.V. Pérez-Arribas, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 2303.
- (328) V. Guillén-Casla, J. Magro-Moral, N. Rosales-Conrado, L.V. Pérez-Arribas, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 3547.
- (329) J. Ye, Q. Zhang, A. Zhang, Y. Wen, W. Liu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83 (2009):85.
- (330) S. Fanali, G.D'Orazio, A. Rocco, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1423.
- (331) A.K. Si, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, *Chromatographia*, 62 (2005) 571.
- (332) Z. Li, T. Wu, Q. Li, B. Zhang, W. Wang, J. Li, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5718.
- (333) Y. Zhang, D. Liu, J. Diao, Z. He, Z. Zhou, P. Wang, X. Li, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 12878.
- (334) J. Diao, P. Xu, P. Wang, Y. Lu, D. Lu, Z. Zhou, *Environ. Sci. Technol.*, 44 (2010) 2042.
- (335) M.C. Waldhier, M.A. Gruber, K. Dettmer, P.J. Oefner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 695.

- (336) Y. Xiao, T.T. Tan, S.C. Ng, *Analyst.*, 136 (2011) 1433.
- (337) P. Dimitrova, H.J. Bart, *Anal. Chim. Acta.*, 663 (2010) 109.
- (338) M. Haroun, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Talanta*, 68 (2006) 1032.
- (339) Y. Song, M. Shenwu, S. Zhao, D. Hou, Y.M. Liu, *J. Chromatogr. A*, 1091 (2005) 102.
- (340) G. D'Orazio, A. Cifuentes, S. Fanali, *Food Chem.*, 108 (2008) 1114.
- (341) I. Poplewska, R. Kramarz, W. Piatkowski, A. Seidel-Morgenstern, D. Antos, *J. Chromatogr. A*, 1192 (2008) 130.
- (342) Y. Song, Y. Feng, M.H. LeBlanc, S. Zhao, Y.M. Liu, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 8121.
- (343) A.M. Piccinini, M.G. Schmid, T. Pajpanova, S. Pancheva, E. Grueva, G. Gübitz, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61 (2004) 11.
- (344) A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 904 (2000) 1.
- (345) S.M. Staroverov, M.A. Kuznetsov, P.N. Nesterenko, G.G. Vasiarov, G.S. Katrukha, G.B. Fedorova, *J. Chromatogr. A*, 1108 (2006) 263.
- (346) G.S. Ding, Y. Liu, R.Z. Cong, J.D. Wang, *Talanta*, 62 (2004) 997.
- (347) K. Petritis, A. Valleix, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 331.
- (348) E. Tesarová, Z. Bosáková, I. Zusková, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 147.
- (349) C.M. Courderot, F.X. Perrin, Y.C. Guillaume, T.T. Truong, J. Millet, M. Thomassin, J.P. Chaumont, L. Nicod, *Anal. Chim. Acta.*, 457 (2002) 149.
- (350) B. Natalini, R. Sardella, G. Carbone, A. Macchiarulo, R. Pellicciari, *Anal. Chim. Acta*, 638 (2009) 229.
- (351) B. Natalini, R. Sardella, A. Macchiarulo, R. Pellicciari, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 108.
- (352) M. Zaher, C. Ravelet, I. Baussanne, A. Ravel, C. Grosset, J.L. Décout, E. Peyrin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 655.
- (353) W. Weng, Q.H. Wang, B.X. Yao, Q. L. Zeng, *J. Chromatogr. A*, 1042 (2004) 81.
- (354) J. Haginaka, C. Kagawa, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1907.
- (355) L. Qin, X.W. He, W.Y. Li, Y.K. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 94.
- (356) Y. Tang, J. Zukowski, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 743 (1996) 261.
- (357) D. Kreidler, H. Czesla, V. Schurig, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 208.
- (358) M.G. Zampolli, G. Basaglia, F. Dondi, R. Sternberg, C. Szopa, M.C. Pietrogrande, *J. Chromatogr. A*, 1150 (2007) 162.
- (359) V. Farkas, T. Tóth, G. Orosz, P. Huszthy, M. Hollósi, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 17 (2006) 1883.

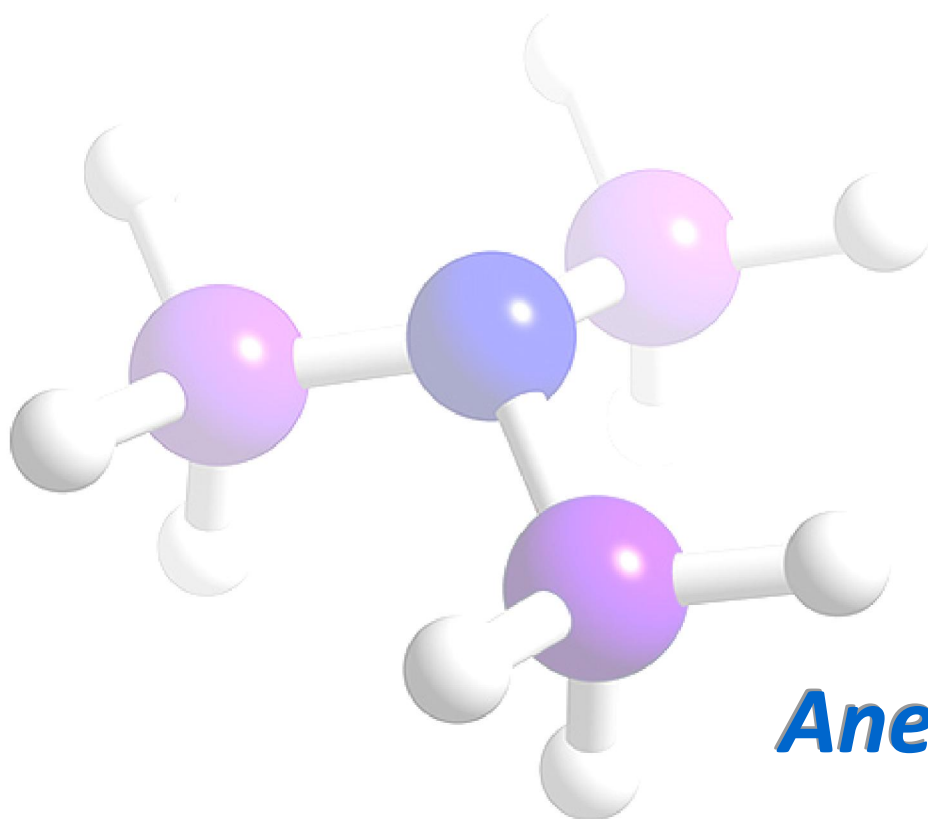
- (360) W.R. Oberleitner, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 960 **(2002)** 97.
- (361) C.V. Hoffmann, R. Reischl, N.M. Maier, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 1216 **(2009)** 1147.
- (362) K. Hamase, A. Morikawa, T. Ohgusu, W. Lindner, K. Zaitsev, *J. Chromatogr. A*, 1143 **(2007)** 105.
- (363) Y. Miyoshi, K. Hamase, Y. Tojo, M. Mita, R. Konno, K. Zaitsev, *J. Chromatogr. B*, 877 **(2009)** 2506.
- (364) H. Han, Y. Miyoshi, K. Ueno, C. Okamura, Y. Tojo, M. Mita, W. Lindner, K. Zaitsev, K. Hamase, *J. Chromatogr. B*, Artículo en prensa **(2011)** doi:10.1016/j.jchromb.2011.01.023.
- (365) P. Jandera, M. Skavrada, K. Klemmová, V. Backovská, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 917 **(2001)** 123.
- (366) K.W. Busch, M.A. Busch, *“Chiral Analysis”*. Elsevier (1º Ed), Holanda **(2006)**.
- (367) C. Desiderio, C.M. Polcaro, E. Padiglioni, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 781 **(1997)** 503.
- (368) B.A. Ingelse, J.C. Reijenga, M. Flieger, F.M. Everaerts, *J. Chromatogr. A*, 791 **(1997)** 339.
- (369) H. Hödla, M.G. Schmida, G. Gübitz, *J. Chromatogr. A*, 1204 **(2008)** 210.
- (370) I. Ilisz, G. Fodor, R. Iványi, L. Szente, G. Tóth, A. Péter, *J. Chromatogr. B*, 875 **(2008)** 273.
- (371) S. Fanali, M. Crucianelli, F. de Angelis, C. Presutti, *Electrophoresis*, 23 **(2002)** 3035.
- (372) Y. Walbroehl, J. Wagner, *J. Chromatogr. A*, 685 **(1994)** 321.
- (373) L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle, *“Multidimensional Chromatography”*. John Wiley and Sons (1º Ed), Chichester **(2002)**.
- (374) L. Ciésła, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. A*, 1216 **(2009)** 1035.
- (375) D.Y. Zhou, Q. Xu, X.Y. Xue, F.F. Zhang, X.M. Liang, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 49 **(2009)** 207.
- (376) S.A. Cohen, M.R. Schure, *“Multidimensional Liquid Chromatography. Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences”*. John Wiley & Sons (1º Ed), Canadá **(2008)**.
- (377) G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, *J. Chromatogr. A*, 1189 **(2008)** 109.
- (378) X. Li, D. R. Stoll, P. W. Carr, *Anal. Chem.*, 81 **(2009)** 845.
- (379) P. Schoenmakers, P. Marriott, J. Beens, *LC-GC*, 16 **(2003)** 1.

- (380) K.M. Pierce, J.C. Hoggard, R.E. Mohler, R.E. Synovec, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 341.
- (381) J.N. Fairchil, K. Horváth, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1363.
- (382) E.M. Sheldon, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 31 (2003) 1153.
- (383) H. Gu, Y. Huang, M. Filgueira, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6675.
- (384) C.R. Evans, J.W. Jorgenson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1952.
- (385) P.Q. Tranchida, M. Zoccali, G. Purcaro, S. Moret, L. Conte, M. Beccaria, P. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, Artículo en prensa (2011) doi:10.1016/j.chroma.2011.06.089.
- (386) P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 3.
- (387) M. Faraoni, A. Messina, C. M. Polcaro, Z. Aturki, M. Sinibaldi, *J Liq Chrom Relat Tech*, 27 (2004) 995.
- (388) M. Hutta, I. Rybár, M. Chalányov, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 143.
- (389) F. Mancini, J. Fiori, C. Bertucci, V. Cavrini, M. Bragieri, M.C. Zanotti, A. Liverani, V. Borzatta, V. Andrisano, *J. Chromatogr. A*, 1046 (2004) 67.
- (390) Q.B. Cass, R.V. Oliveira, A.C. de Pietro, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5822.
- (391) M. Herrero, E. Ibañez, A. Cifuentes, J. Bernal, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7110.
- (392) T. Welsch, C. Schmidtkunz, B. Müller, F. Meier, M. Chlup, A. Köhne, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388 (2007):1717.
- (393) K. Hamase, Y. Miyoshi, K. Ueno, H. Han, J. Hirano, A. Morikawa, M. Mita, T. Kaneko, W. Lindner, K. Zaitzu, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1056.
- (394) A. Morikawa, K. Hamase, K. Zaitzu, *Anal. Biochem.*, 312 (2003) 66.
- (395) Y. Miyoshi, K. Hamase, T. Okamura, R. Konno, N. Kasai, Y. Tojo, K. Zaitzu, *J. Chromatogr. B*, Artículo en prensa (2011) doi: 10.1016/j.jchromb.2010.08.024.
- (396) C. Cheng, S.C. Wu, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 2976.
- (397) Y. Tojo, K. Hamase, M. Nakata, A. Morikawa, M. Mita, Y. Ashida, W. Lindner, K. Zaitzu, *J. Chromatogr. B*, 875 (2008) 174.
- (398) C. Mongay-Fernández, "Quimiometría". Universitat de Valencia (eds) (1º Ed), Valencia (2005).
- (399) M. Otto, "Chemometrics. Statics and computer application in analytical chemistry". Wiley-VCN (2º Ed), Nueva York (1999).
- (400) S. Pous-Torres, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García- Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, 1193 (2009) 117.
- (401) E. Rodriguez, F.N. Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 605.

- (402) I.S. Arvanitoyannis, M. van Houwelingen-Koukaliaroglou, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43 **(2003)** 173.
- (403) I.S. Arvanitoyannis, C. Chalhoub, P. Gotsiou, N. Lydakis-Simantiris, P. Kefalas, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 **(2005)** 93.
- (404) I.S. Arvanitoyannis, N.E. Tzouros, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 **(2005)** 231.
- (405) K. Héberger, E. Csomós, L.S. Sarkadi, *J. Agric. Food Chem.*, 51 **(2003)** 8055.
- (406) R.C.S. Oliveira, L.S. Oliveira, A.S. Franca, R. Augusti, *J. Food Compos. Anal.*, 22 **(2009)** 257.
- (407) A. Versari, G.P. Parpinello, A.U. Mattioli, S. Galassi, *Food Chem.*, 108 **(2008)** 334.
- (408) E.C. Shin, B.D. Craft, R.B. Pegg, R.D. Phillips, R.R. Eitenmiller, *Food Chem.*, 119 **(2009)** 1262.
- (409) S.M. Szkudlarz, H.H. Jelen, *Food Chem.*, 110 **(2008)** 751.
- (410) I.S. Arvanitoyannis, O.B. Vaitsi, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 47 **(2007)** 675.
- (411) A. Versari, G.P. Parpinello, S. Galassi, *J. Food Compos. Anal.*, 15 **(2002)** 251.
- (412) X. Liu, X. Chen, W. Wu, Y. Zhang, *Food Chem.*, 17 **(2006)** 119.
- (413) R. Kizil, J. Irudayaraj, *J. Agric. Food Chem.*, 54 **(2006)** 13.
- (414) Z. Seregély, J. Farkas, E. Tuboly, I. Dalmadi, *Chemometr. Intel. Lab. Syst.*, 82 **(2006)** 115.
- (415) G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkassel, Y. Vander-Heyden, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 1096 **(2005)** 133.
- (416) G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkassel, Y. Vander-Heyden, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 1096 **(2005)** 146.
- (417) M. Caselli, G. Gianluigi, P. Lelpo, *LC-GC-Europ*, 2 **(2002)** 104.
- (418) P.K. Dasgupt, *J. Chromatogr. A*, 1213 **(2008)** 50.
- (419) P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, *J. Chromatogr. A*, 912 **(2001)** 13.
- (420) L. Jianwei, *J. Chromatogr. A*, 952 **(2002)** 63.
- (421) Y. Kalambet, Y. Kozmin, K. Mikhailova, I. Nagaev, P. Tikhonov, *J. Chemometrics*, 25 **(2011)** 352.
- (422) H. Kong, F. Ye, X. Lu, L. Guo, J. Tian, G. Xu, *J. Chromatogr. A*, 1086 **(2005)** 160.
- (423) J. Krupčík, J. Mydlová, I. Spánik, B. Tienpont, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 1084 **(2005)** 80.
- (424) R. Kiesswetter, F. Brandl, N. Kastner-Pustet, A. Mannschreck, *Chirality*, 15 **(2003)** S40.
- (425) J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campís-Falcó, *J. Chromatogr. A*, 930 **(2001)** 95.

- (426) B.J. Asher, L.A. D'Agostino, J.D. Way, C.S. Wong, J.J. Harynuk, *Chemosphere* 75 (2009) 1042.
- (427) Norma internacional ISO 11508, "Soil quality-Determination of particle density". International Organization for Standardization, BS 7755-5.3:1998 (1998) 1998E.
- (428) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, "Métodos oficiales de análisis. Tomo III: suelos y aguas". Madrid (1994) ISBN 84-491-0003-8.
- (429) C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C- Pérez-Conde, M. Vidal, "Toma y tratamiento de muestras". Editorial Síntesis(1ª Ed), Madrid (2002).
- (430) ASTM, "Standard Practice for Use of Cellulose Acetate Dosimetry Systems". American Society for Testing and Materials, vol. 12.02. (2000) E1650.
- (431) AOAC Official Method 981, "Crude Protein in Meat Block – Digestion Method". AOAC, (1998b).
- (432) Dionex Application Note, no. 345, "Extraction of fat from dairy products (cheese, butter and liquid milks) using Accelerated Solvent Extraction (ASE)". Dionex Corporation, (2000).
- (433) Dionex Application Note, no. 334, "Rapid determination of fat in meat using Accelerated Solvent Extraction (ASE)". Dionex Corporation, (2000).
- (434) AOAC Official Method 930.15, "Moisture in Animal Feed.". AOAC, (1998b).
- (435) ISO 14673-1 Official Method, "Meat and milk products – determination of nitrate and nitrite contents. Part 1. Method using cadmium reduction and spectrometry", (2004).
- (436) M. Almeida-Bezerra, R. Erthal-Santelli, E. Padua-Oliveira, L. Silveira-Villar, L. Amélia-Escaleira, *Talanta*, 76 (2008) 965.
- (437) E. López Galán, F. Miñano Fernández, "Metodos rapidos de analisis de suelos". Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Servicio de Extensión Agraria, Madrid (1988).
- (438) C. Díez, E. Barrado, P. Marinero, M. Sanz, *J. Chromatogr. A*, 1180 (2008) 10.
- (439) D. Ly, K. Kang, J.Y. Choi, A. Ishihara, K. Back, S.G. Lee, *J. Med. Food*, 11 (2008) 385.
- (440) X Subirats, M. Rosés, E. Bosch, *Separ. Purif. Rev.*, 36 (2007) 231.
- (441) A. Numan, N.D. Danielson, *Anal. Chim. Acta*, 460 (2002) 49.
- (442) J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Chromatographia*, 18 (1984) 503.
- (443) A. Önal, *Food Chem.*, 103 (2007) 1475.
- (444) A. Junza, R. Amatya, D. Barrón, J. Barbosa, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 2601.
- (445) J. Goihl, *Feedstuffs*, 78 (2006) 12.
- (446) M.H. Gendle, A.C. Golding, *Hum. Psychopharmacol.*, 25 (2010) 491.

- (447) K. Shaw, J. Turner, C. del Mar, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3 (2001) CD003198.
- (448) V. Pascual, R.M. Valls, R. Solà, *Clin. Invest. Arterioscl.*, 21 (2009) 198.
- (449) E.H. Turner, J.M. Loftis, A.D. Blackwell, *Pharmacol. Ther.*, 109 (2006) 325.
- (450) L. Chacón, M.E. Leon-González, L.M. Polo-Díez, "Chiral separation of enantiomers of amino acids by high performance liquid chromatography on a teicoplanin chiral stationary phase". Comunicación en la VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas afines, SECyTA), Vigo, España (2006).
- (451) T.E. Beesley, J. Lee, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 32 (2009) 1733.
- (452) A. Cavazzini, G. Nadalini, F. Dondi, F. Gasparrini, A. Ciogli, C. Villani, *J. Chromatogr. A*, 1031 (2004) 143.
- (453) T. Langrock, P. Czihal, R. Hoffmann, *Amino Acids*, 30 (2006) 291.
- (454) R.I. Chirit, C. West, S. Zubrzycki, A.L. Finaru, C. Elfakir, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5939.
- (455) N. Romero, "Producción y manejo de composición química en alimentos en nutrición". Depósito de documentos de la FAO, Roma (1997) cap. 15.
- (456) Dionex Application Note, no. 163, "Determination of Protein Concentrations Using AAA-Direct™". Dionex Corporation (2000).
- (457) J.S. Min, S.O. Lee, A. Jang, C. Jo, M. Lee, *Poult. Sci.*, 86 (2007) 2034.
- (458) C. Krack, G. Sontag, S. Solar, *Food Res. Int.*, 32 (1999) 43.
- (459) M. Lacroix, B. Ouattara, *Food Res. Int.*, 33 (2000) 719.
- (460) P.Y.Y Wong, A. Nilmini Wijewickreme, D.D Kitts, *Food Chem.*, 89 (2005) 93.
- (461) L.M.L. Nollet, F. Toldrá, "Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis". CRC Press Taylor & Francis Group LLC (1ª Ed), Boca Raton (2009).
- (462) K.O. Honikel, *Meat Sci.*, 72 (2008) 68.



Anexo I

One- and Two-Dimensional Direct Chiral Liquid Chromatographic Determination of Mixtures of Diclofop-Acid and Diclofop-Methyl Herbicides

VANESA GUILLÉN-CASLA, LUIS VICENTE PÉREZ-ARRIBAS,*
MARÍA EUGENIA LEÓN-GONZÁLEZ, AND LUIS MARÍA POLO-DÍEZ

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

Simple one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography (HPLC) methods for the simultaneous enantiomeric determination of alkyloxyphenoxypropionic acid herbicides is presented. Compounds studied were (*R,S*)-2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy]propionic acid (diclofop-acid) and (*R,S*)-2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)]methyl propionate (diclofop-methyl). Mobile phases necessary to separate their enantiomers on an α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase are different; therefore, the simultaneous separation by an isocratic mode is not possible. The chiral separation method proposed involves a one-step gradient allowing for the simultaneous determination of both racemic enantiomers. Detection limits of the method were 0.03 mg/L for both diclofop-acid enantiomers and 0.14 and 0.15 mg/L for diclofop-methyl enantiomers, respectively. The two-dimensional method involves the use of two chromatographs in one achiral-chiral coupling. The LC–LC method is more suitable for complex samples because it involves an online cleanup effect. Detection limits were 1.25 and 1.87 mg/L for diclofop-acid and 2.70 and 3.02 mg/L for diclofop-methyl enantiomers, respectively. Accuracy, repeatability, and reproducibility have been studied in standard samples and a technical product.

KEYWORDS: Diclofop; chiral analysis; two-dimensional HPLC; column switching; chiral herbicides

1. INTRODUCTION

At present, about 25% of the agrochemicals used in the world are chiral compounds, which are usually applied as racemic mixtures, but in general, only one of the enantiomers is significantly more active than the other and produces the desired effect. That is because, although enantiomers have identical physical and chemical properties, their behavior in biological systems could be completely different, because biological transformation of chiral compounds in animals, plants, and microorganisms can be stereoselective (1, 2). Despite the importance of this enantiomer behavior, only a small fraction of pesticides are manufactured and used as pure enantiomers (3, 4). In particular, (*R,S*)-2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy]propionic acid (diclofop-acid) and (*R,S*)-2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)]methyl propionate (diclofop-methyl) (Figure 1) are organochlorine herbicides that present chirality; they are fatty acid synthesis inhibitors that destroy the cell membrane, prevent the translocation of assimilates to roots, reduce the chlorophyll content, inhibit photosynthesis, and have meristem activity. The diclofop-methyl (*R*) enantiomer shows significantly greater

herbicidal activity than the (*S*) enantiomer (*S*); therefore, to reduce the amount of herbicides used and prevent unnecessary enantiomer use causing some adverse impact, several European countries have suggested that only the active enantiomer should be employed. Under alkaline conditions, diclofop-methyl rapidly hydrolyzes into diclofop-acid, which has higher solubility in water and lower acute toxicity than its parent compound. Consequently, there is an urgent need to develop analytical methods to determine the optical purity, stereoselective bioactivity, and environmental behavior of these chiral pesticides.

Thus, several analytical methods have been used to control the enantiomeric purity of herbicides formulations, including

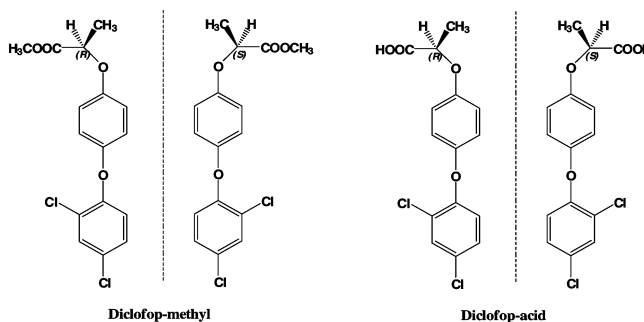
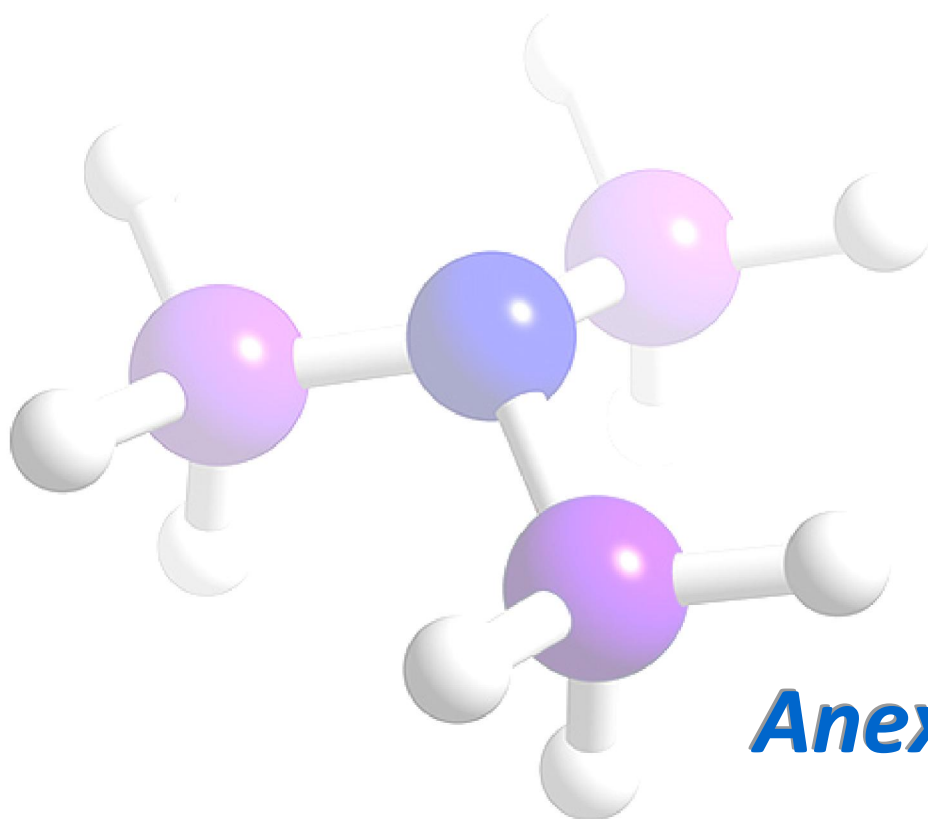


Figure 1. Chemical structures of the two diclofop herbicide forms.

* To whom correspondence should be addressed: Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Telephone: +34-913944330. Fax: +34-913944329. E-mail: lvperez@quim.ucm.es.



Anexo II

Direct chiral determination of free amino acid enantiomers by two-dimensional liquid chromatography: application to control transformations in E-beam irradiated foodstuffs

Vanesa Guillén-Casla · María Eugenia León-González ·
Luis Vicente Pérez-Arribas · Luis María Polo-Díez

Received: 14 October 2009 / Revised: 1 December 2009 / Accepted: 2 December 2009 / Published online: 22 December 2009
© Springer-Verlag 2010

Abstract Changes in free amino acids content and its potential racemization in ready-to-eat foods treated with E-beam irradiation between 1 and 8 kGy for sanitation purposes were studied. A simple heart cut two-dimensional high performance liquid chromatographic method (LC–LC) for the simultaneous enantiomeric determination of three pairs of amino acids used as markers (tyrosine, phenylalanine, and tryptophan) is presented. The proposed method involves the use of two chromatographs in an LC–LC achiral–chiral coupling. Amino acids and their decomposition products were firstly separated in a primary column (C_{18}) using a mixture of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 6) (94%) and methanol (6%) as the mobile phase. Then, a portion of each peak was transferred by heart cutting through a switching valve to a teicoplanin-chiral column. Methanol (90%)/water (10%) was used as the mobile phase. Ultraviolet detection was at 260 nm. Detection limits were between 0.16 and 3 mg L⁻¹ for each enantiomer. Recoveries were in the range 79–98%. The LC–LC method combined with the proposed sample extraction procedure is suitable for complex samples; it involves an online cleanup, and it prevents degradation of protein, racemization of L-enantiomers, and degradation of tryptophan. Under these conditions, D-amino acids were not found in any of the analyzed samples at detection levels of the proposed method.

Keywords Amino acids/peptides · Chiral analysis · Foods/beverages · HPLC · Multidimensional liquid chromatography · Column switching

Abbreviations

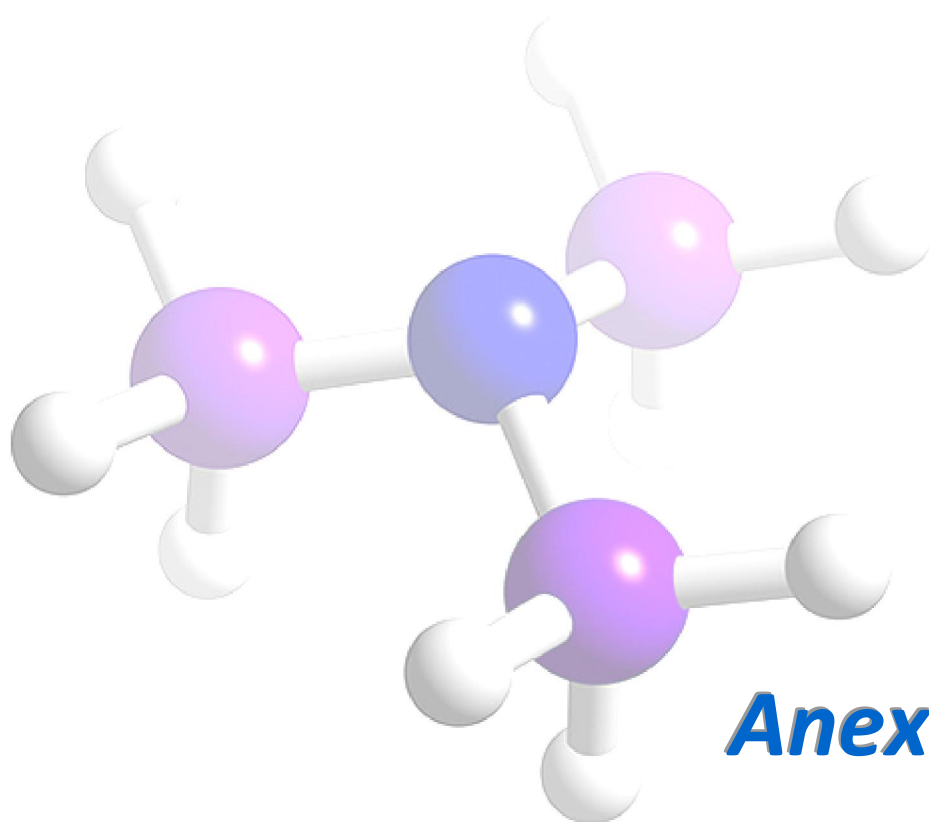
aa	Amino acid
CSP	Chiral stationary phase
e.e	Enantiomeric excess
ER _{1/2}	Enantiomeric ratio
HPLC	High performance liquid chromatography
LC	Liquid chromatography
LC–LC	Heart cut two-dimensional high performance liquid chromatography
ODS	Octadecyl silane
SD	Standard deviation
TEAA	Triethylamine acetate

Introduction

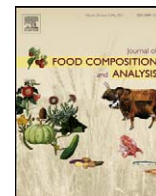
Changes in the world population habits have produced an increase in the manufacture of a great variety of ready-to-eat (RTE) foods of both vegetable and animal origin. Consumption of RTE is becoming more and more frequent, and the food industry provides a vast variety of products, including pre-packed and precooked foods in individual or family-size packages with very different presentations. Preparation of these products involves processing operations and further manipulations such as cutting, slicing, dosing, and packing, in which a variety of pathogenic microorganisms from the environment, mechanical equipment, tools used, handlers, etc., can reach the food, thus increasing contamination risks; therefore, it is necessary to eliminate this potential contamination in order to enhance RTE shelf life and ensure that they are microbiologically safe [1].

E-beam irradiation involves direct exposure of the RTE foods to E-beam rays. It is a very effective process in killing many of the common microbial pathogens including *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmo-*

V. Guillén-Casla · M. E. León-González ·
L. V. Pérez-Arribas (✉) · L. M. Polo-Díez
Dpto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid,
28040 Madrid, Spain
e-mail: lvperez@quim.ucm.es



Anexo III



Original Article

Principal component analysis (PCA) and multiple linear regression (MLR) statistical tools to evaluate the effect of E-beam irradiation on ready-to-eat food

Vanesa Guillén-Casla, Noelia Rosales-Conrado ^{*}, María Eugenia León-González, Luis Vicente Pérez-Arribas, Luis María Polo-Díez

Dpto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2010

Received in revised form 25 October 2010

Accepted 3 November 2010

Available online 22 December 2010

Keywords:

RTE food

E-beam irradiation

Chemometric tools

Principal component analysis (PCA)

Multiple linear regression (MLR)

Food analysis

Food composition

ABSTRACT

The effect of E-beam irradiation on cooked and dry cured Iberian ham, minced meat, smoked salmon and soft cheese, which have different chemical compositions with respect to protein, fat, moisture, free amino acids, amino acid decomposition products and preservatives intentionally added (nitrate and nitrite), was evaluated. A decrease up to 50% in fat content was observed with the irradiation increase for cooked ham and smoked salmon. Protein was modified only in cooked ham samples, while free amino acid amounts were significantly affected in all cases. Nitrate and nitrite content were affected in cooked and Iberian ham, with losses up to 100%, and in smoked salmon. Principal component analysis (PCA) was used to model the data. The results obtained made it possible to establish that radiation doses of 6 and 8 kGy produce chemical composition changes in practically every foodstuff. At the radiation of 2 kGy, which is the dose required to reach the food safety objective (FSO), dry cured Iberian ham was the least affected food, whereas minced meat and cooked ham were the most affected. Stepwise multiple-linear regression (MLR) explained changes in nitrate and nitrite content with the radiation dose applied and the food chemical composition (especially with moisture, fat and protein).

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

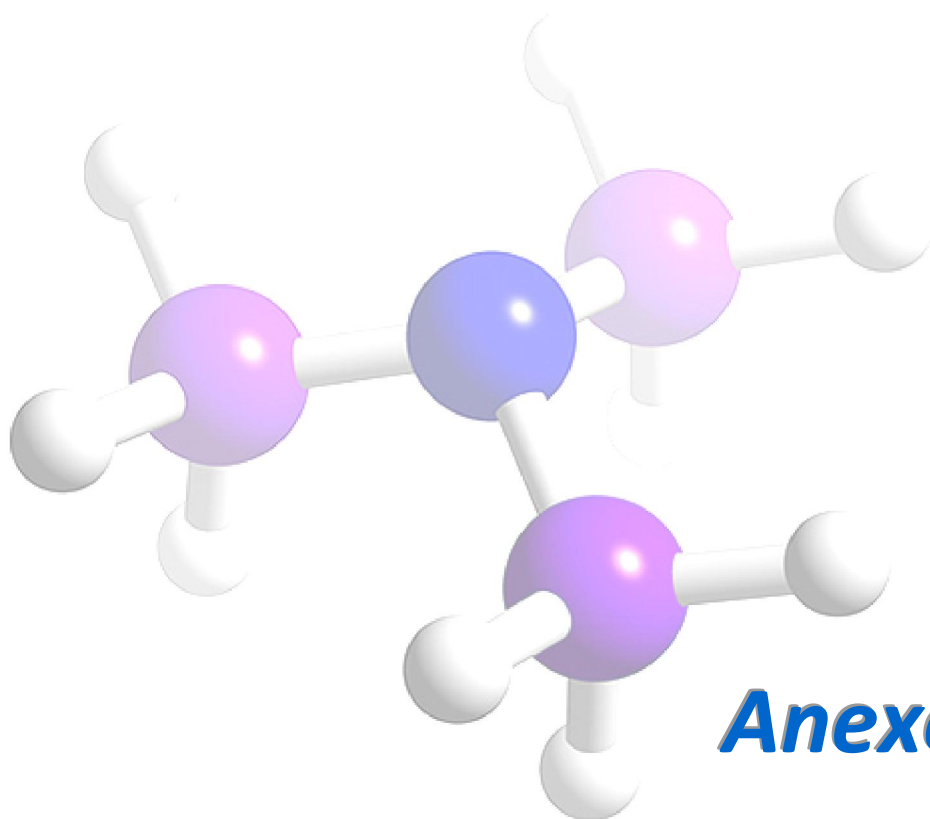
The consumption of prepared foods in developed societies is increasingly frequent. This situation has led to a marked increase in the manufacture of ready-to-eat (RTE) products by food industries and distribution companies, with an extraordinary variety of presentations and contents. Operations like cutting, slicing, dosing or packaging increase the risk of cross-contamination during industrial manufacturing. In many cases, these products are vacuum- or modified-atmosphere packaged, and must be kept refrigerated for sale in order to extend shelf-life. The preservation operations remarkably limit the microbiota able to survive and grow in such conditions, but different types of bacteria can contaminate food in these processing operations (Rocourt et al., 2003). The importance of these bacteria is quite diverse. For example, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. are frequently detected in a wide variety of foods, and they can be considered ubiquitous. However, *Yersinia enterocolitica* is an authentic psychrotroph and, even under strict refrigeration conditions (<3 or <4 °C), it can be the only pathogen able to grow.

Irradiation is an effective and well-known method aimed at eliminating pathogens present in food. Although the World Health Organization (WHO) has stated that irradiating food at doses up to 10 kGy does not introduce any special nutritional losses, there are various different approaches to safety treatments (Lacroix and Ouattara, 2000; Stefanova et al., 2010).

The irradiation effect on a wide variety of foods is a subject of safety concern. Some reports (Seregely et al., 2006) indicate that irradiation may produce secondary effects and promote the appearance of toxic chemical compounds, or generate volatile substances that can modify organoleptic properties of the final product. In addition, major as well as minor components of foods may be chemically altered to some extent after irradiation (Sommers and Xuetong, 2006). In particular, some changes in protein and fat content may occur as ionizing radiation generates free radicals that may induce lipid peroxidation, colour and odour alteration (Carrasco et al., 2005; Nam et al., 2002; Kim et al., 2002; Cabeza et al., 2007, 2009; Medina et al., 2009; Barba et al., 2009). Therefore, it is critical to carefully adjust irradiation doses to achieve an adequate level of microbial safety without significantly affect food quality and consumer acceptance.

Modern analytical instruments make it possible to produce a large amount of information (variables) for a large number of samples (objects) which can be analyzed in a relatively short lapse

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 91 394 43 68; fax: +34 91 394 43 29.
E-mail address: noerosales@quim.ucm.es (N. Rosales-Conrado).



Anexo IV

Direct chiral liquid chromatography determination of aryloxyphenoxypropionic herbicides in soil: deconvolution tools for peak processing

V. Guillén-Casla · J. Magro-Moral ·
N. Rosales-Conrado · L. V. Pérez-Arribas ·
M. E. León-González · L. M. Polo-Díez

Received: 2 February 2011 / Revised: 23 March 2011 / Accepted: 28 March 2011 / Published online: 13 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract In this paper, the enantiomeric separation of two aryloxyphenoxypropionic esters (fluazifop-butyl and quizalofop-ethyl) and a safener herbicide (mefenpyr-diethyl), which is widely used for protecting crop plants, has been studied by direct liquid chromatography (LC) with UV detection on an α_1 -acid glycoprotein as chiral stationary phase. Optimization of separation conditions was done by factorial experimental design. Experimental factors and ranges selected were propanol (5–10%), phosphate buffer pH (6.5–7.0), and column temperature (15–25 °C). Responses were expressed in terms of enantioresolution (R_s) and adjusted retention time of the second eluted enantiomer (t_{r2}). The chemometric method used to explore data was response surface analysis. Multiple response analyses were carried out to determine the combination of experimental factors which simultaneously optimize experimental responses. Under optimum conditions for enantio-separation of each herbicide, partially overlapped or fully resolved enantiomers were obtained. Deconvolution tools were employed as an integration method to fit chromatographic data and to achieve a more precise enantiomeric ratio (ER) and enantiomeric fraction (EF) values. Applicability of both direct chiral LC and peak deconvolution methods was evaluated in spiked soil samples at different

R/S enantiomeric ratios. Acceptable and reproducible recoveries between 71% and 96% with precision in the range 1–6% were achieved for herbicide-spiked levels from 0.50 to 9.0 $\mu\text{g g}^{-1}$. In addition, parameters such as R_s , ER, and EF were calculated and compared with values obtained using the common valley drop integration method.

Keywords HPLC · Chiral analysis · Pesticides · Chemometrics · Peak deconvolution · Soil

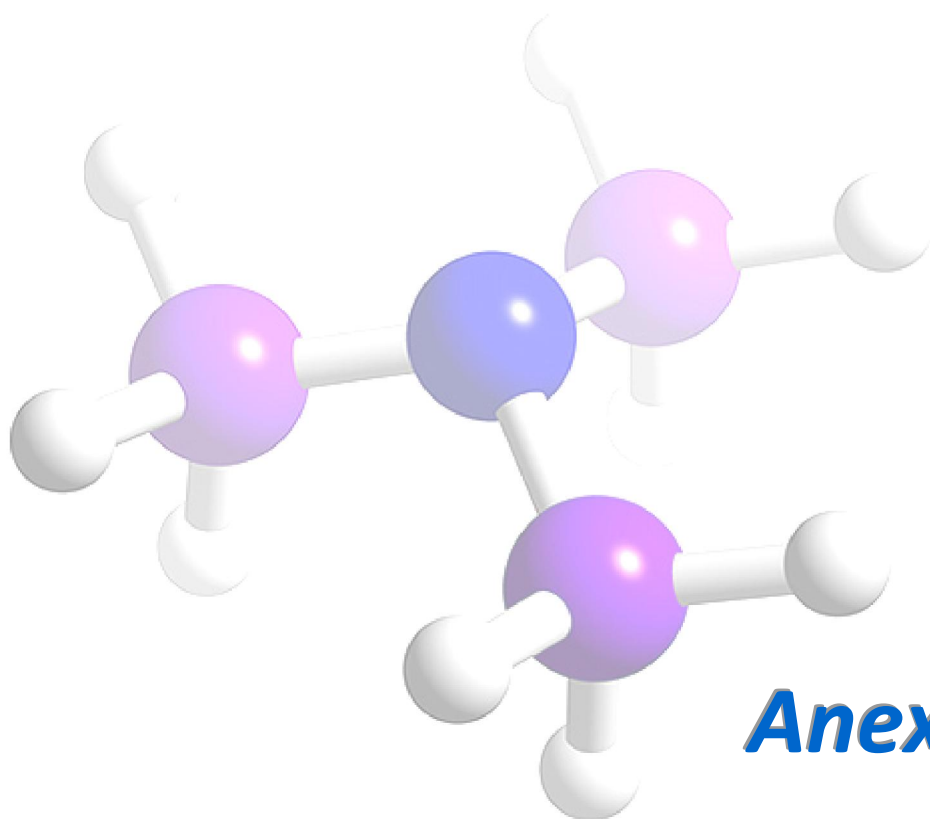
Introduction

Aryloxyphenoxypropionic acids (ArPPs) are a new class of herbicides widely used and commercialized as esters for the selective removal of most grass species from any non-grass crop. These compounds are more active in post-emergence (foliar) applications [1], and they are often applied at the low levels of liters per hectare together with safener herbicides, which selectively protect crop plants from herbicide damage without reducing activity in target weed species [2]. Some of these herbicides present chirality, and generally, the *R*-(+) enantiomer shows great herbicidal activity and produces the desired effect [1]. Therefore, in order to prevent unnecessary enantiomer use causing adverse environmental impact, only the active isomer should be employed [3, 4].

At present, direct high-performance liquid chromatography (HPLC) based on chiral stationary phases (CSPs) is a preferred method for herbicide chiral separations. Among a wide variety of natural and synthetic CSPs, phenylcarbamates of cellulose and amylose have been mainly employed in normal phase mode for enantiomeric analysis of diclofop-methyl and diclofop acid [5–9], quizalofop-ethyl [5], and fenoxaprop-ethyl [10]. Separation of racemic

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-011-4969-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Guillén-Casla · J. Magro-Moral · N. Rosales-Conrado (✉) ·
L. V. Pérez-Arribas · M. E. León-González · L. M. Polo-Díez
Analytical Chemistry Department, Faculty of Chemistry,
Complutense University of Madrid,
Avda. Complutense s/n,
28040 Madrid, Spain
e-mail: noerosales@quim.ucm.es



Anexo V



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection

V. Guillén-Casla*, N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, E-28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Serotonin
L-Tryptophan
5-Hydroxytryptophan
Capillary liquid chromatography
Mass spectrometry
Chemometrics
Chocolate

ABSTRACT

A method for the analysis of serotonin (5-HT) and its precursors, 5-hydroxytryptophan (5-HTP) and L-tryptophan (TP) in chocolate samples by capillary liquid chromatography–mass spectrometry (cLC–MS) has been developed. Optimum chromatographic conditions were established by using a personalized multifactorial experimental design. Finally the cLC separation was achieved through a mixture of acetonitrile and 5 mM ammonium formate at pH 4 (3:97, v/v) as mobile phase in gradient elution, setting the injection volume at 10 μ L and using pure water as injection solvent for focusing purposes on the head of the capillary column. For extraction of targets in chocolate samples a new, fast and simple procedure based on the use of acidic extraction medium and sonication was developed. Working in selected ion mode (m/z 177 for 5-HT, m/z 205 for L-tryptophan and m/z 221 for 5-HTP) detection limits were between 0.01 and 0.11 μ g g^{−1} and linearity was in the concentration range of 0.5–25 μ g g^{−1}. Recoveries higher than 76% with RSDs lower than 8% were obtained from spiked samples for all analytes, showing the effectiveness of the proposed method. Serotonin and its precursors were determined in 5 kinds of commonly consumed chocolates with different cocoa contents (70–100%). The highest serotonin content was found in chocolate with a cocoa content of 85% (2.93 μ g g^{−1}). Regarding L-tryptophan, the highest content of this amino acid (13.27–13.34 μ g g^{−1}) was found in chocolate samples with the lowest cocoa content (70–85%). 5-Hydroxytryptophan was not detected in any chocolate samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chocolate is a highly demanded food considered as “food of happiness” that contains cocoa. The cocoa is produced through a process of fermenting the seeds from the pods of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). The beans are processed resulting an intermediate product which is homogenized with sugar, cocoa butter and sometimes with milk to produce commercial chocolate [1].

Although chocolate consumption is often associated with situations related to anxiety, stress or worries due to the stimulating effect of caffeine and other bioactive amines [2], recent studies have attributed beneficial health effects to its consumption such as protective effect against cardiovascular diseases or inhibition of fluid secretion in the small intestine relieving diarrhea [3].

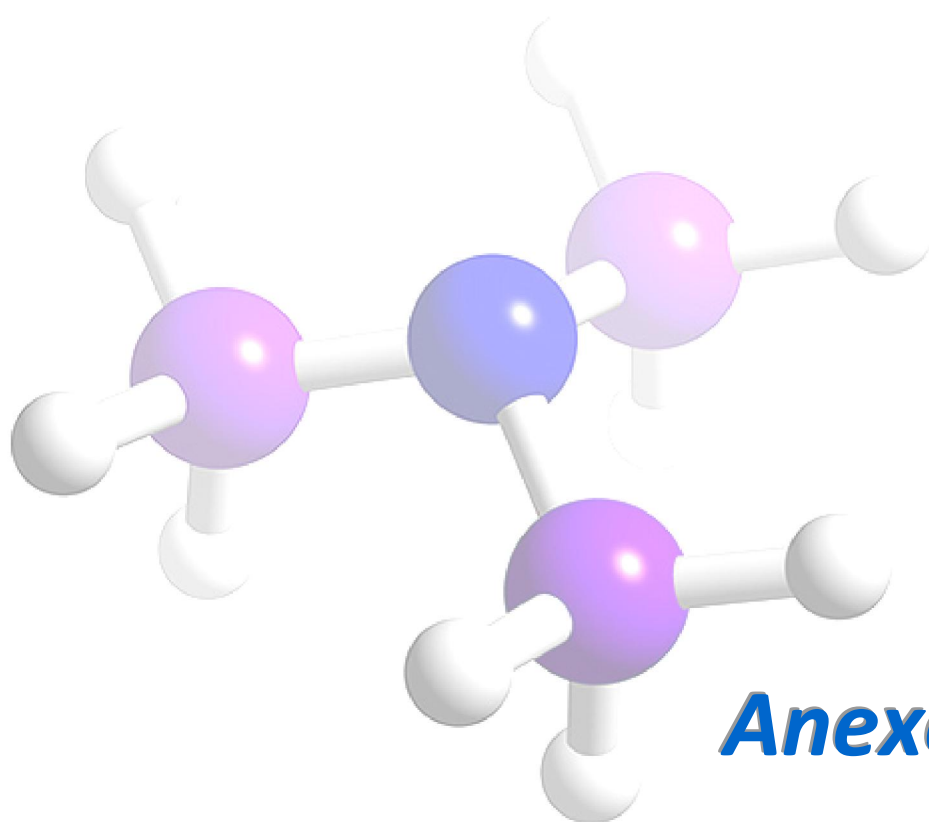
The bioactive indolamine serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an established neurotransmitter and vasoconstrictor in the

central nervous system. Serotonin has a broad activity in human brain, playing an important role in the modulation of anger, aggression, mood and sexuality, appetite, as well in muscle contraction or blood pressure regulation [4–6]. According to de Jong et al. [7], this neurotransmitter is synthesized only from the L-enantiomer of the essential amino acid tryptophan through a short metabolic pathway consisting of two enzymes: tryptophan hydroxylase and amino acid decarboxylase with 5-hydroxytryptophan (5-HTP) as an intermediate [8,9]. On the other hand, interest in the analysis of tryptophan is relevant because it is nutritionally essential for humans and it also takes part in several biological processes [10]. 5-Hydroxytryptophan results due to decarboxylation of serotonin in the presence of vitamin B6 and magnesium. 5-HTP is not found in significant quantities in the diet but it can be obtained from foods with high tryptophan content [11–13].

Pastore et al. [14] and Herraiz [15] detected the presence of serotonin in chocolate at low μ g g^{−1} level. Chocolate contains serotonin, at concentrations which depend on the chocolate type and its cocoa content, dark chocolate containing more than 60% of cocoa is a good source of serotonin and a concentration of 1.4–5 μ g g^{−1} has been reported in it [16]. However, information is scarce about the levels of serotonin and its precursors in chocolate and also, how they are affected during production and processing. Although serotonin

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, UCM, Avda. Complutense s/n, E-28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 41 96; fax: +34 91 394 43 29.

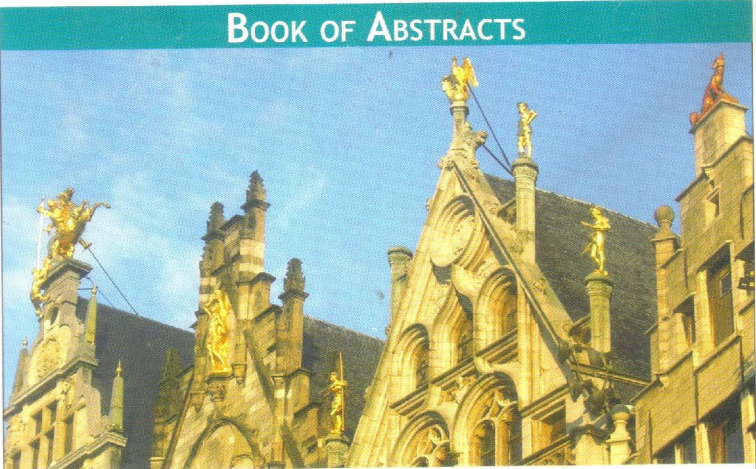
E-mail addresses: vguillen@quim.ucm.es, vanesaguillencasla@gmail.com (V. Guillén-Casla).



Anexo VI

EUROANALYSIS XIV (Amberes, Bélgica 2007)

BOOK OF ABSTRACTS



EUROanalysisXIV
Antwerp, Belgium
9-14 SEPTEMBER 2007
organized by
Division of Analytical Chemistry
European Association for Chemical and Molecular Sciences (EuChemS)
Micro- and Trace Analysis Centre (MiTAC)
Department of Chemistry, University of Antwerp, Belgium
Royal Flemish Chemical Society (KVCV)
in collaboration with
**Joint Research Centre,
 Institute for Reference Materials and Measurements**
Geel, Belgium

468

Euroanalysis XIV Antwerp 2007

DETERMINATION OF CHIRAL TRANSFORMATION OF AMINO ACIDS IN IRRADIATED COOKED HAM BY TWO-DIMENSIONAL HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Vanesa Guillén Casla, Eugenia de Leon González, Luis Vicente Pérez Arribas, Luis María Polo Díez

Complutense University of Madrid, Department of Analytical Chemistry
 Avda. Complutense s/n, ES-28040 Madrid, Spain
 vguillen@quim.ucm.es




The consumption of prepared foods is becoming more frequent. This situation has provoked a strong increase of the manufacture of ready-to-eat (RTE) products. The preparation of RTE products involves operations like cutting, dosing and packaging. Different food pathogens can reach foods in these operations. Nowadays it is possible to apply technologies like accelerated electrons to stop the growth of pathogens but these technologies may cause secondary effects such as racemization of amino acids. Direct HPLC analysis using chiral stationary phases is difficult to carry out due to complexity of samples. Two-dimensional HPLC using an achiral-chiral coupling allows the separation of all the analytes in a sample by a primary column and then a chiral separation in a selective chiral stationary phase after a transference of chiral analytes using a switching valve.

In this communication a rapid hydrolysis with ascorbic acid of irradiated cooked ham samples was developed. The free amino acids studied were tyrosine, phenylalanine and tryptophane. The analytes were previously separated in a primary column (C₁₈), with a mixture of ammonium acetate buffer and methanol as a mobile phase. The enantiomeric separation of the amino acids was carried out by transferring the amino acids through a switching valve to a chiral column at a flow rate of 0.5 ml/min using methanol (90 %) / water (10%) as a mobile phase. UV detection was at 250 nm.

Sessions S9 & S13: Food analysis


poster presentation II

EUROANALYSIS XV (Innsbruck, Austria 2009)

EUROANALYSIS 2009

6 – 10 Sep 2009, Innsbruck, Austria



Chairs Wolfgang Buchberger (Linz) and Wolfgang Lindner (Vienna)

Organisers

DIVISION OF ANALYTICAL CHEMISTRY of the
EUROPEAN ASSOCIATION OF CHEMICAL AND MOLECULAR SCIENCES (EuCheMS)

AUSTRIAN SOCIETY OF ANALYTICAL CHEMISTRY (ASAC)

in cooperation with
AUSTRIAN COUNCIL FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT
represented by Günther Bonn (Innsbruck)

INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS (Geel, Belgium)

Venue Congress Innsbruck

www.euroanalysis2009.at

Abstracts

P027-A2

Direct Chiral Determination of Amino Acids by Two Dimensional (LC-LC) High Performance Liquid Chromatography

V. Guillén-Casía, M.E. León-González, L.V. Pérez-Armbas, L.M. Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

The role of alpha amino acids in biological system is well known. Some D-alpha amino acids have essential functions in living systems as neuromodulators; the human body has a limited capacity to metabolize these enantiomers.; several diseases such as Alzheimer and renal disorders have also been associated with the presence of these compounds.

Formation of D-amino acids in foods is related with some treatments such as heating or some biological processes such as bacterial actions or ripening. The enantiomers ratio is taken as an indicator of the quality of food products.

Nowadays, the consumption of ready-to-eat (RTE) foods is becoming more frequently. The preparation of RTE products involves several operations in which different pathogenic microorganisms can be incorporated to this food. Different technologies such as E-beam irradiation are available to prevent the growth of pathogens, but they may produce radiolysis of proteins as well as racemization of amino acids which can decrease the nutritional RTE food quality.

The potential effect of E-beam irradiation on chiral transformations of amino acids in dry cured Iberian ham was evaluated. The free amino acids studied were tyrosine, phenylalanine and tryptophan, which are especially sensitive to radiation and are used commonly as markers of chiral.

A fast and controlled extraction method based on the use of ascorbic acid, was developed in order to extract free amino acids from samples irradiated with doses up to 8 kGy.

Then, a two dimensional high performance liquid chromatography method was applied. Amino acids were firstly separated in a primary column (C_{18}) using a mixture of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 6) and methanol (6%) as a mobile phase. Then, part of each peak was transferred by heart-cutting through a switching valve to a teleocyanin chiral column; methanol (90 %) / water (10%) was used as a mobile phase. UV detection was at 260 nm. Detection limits were between 0.15 mg·L⁻¹ and 3 mg·L⁻¹ for each enantiomer. Under these conditions, no significant racemization was detected even at high radiation doses.

P131-A2

Evaluation of the Effect of E-Beam Irradiation in Ready to Eat (RTE) Food by Principal Component Analysis (PCA)

N. Rosales-Conrado, V. Guillen-Casla, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

The deep change of the dietary population habits has led to manufacture a great variety of ready-to-eat (RTE) foods which preparation involves processing operations increasing contamination risks by a wide variety of pathogens. To control food contamination, E-beam irradiation is an effective way for sanitation purposes. However, it may produce changes in sensory properties and nutritional food quality.

The aim of the present study was to evaluate the effect of E-beam irradiation on major components of different RTE foods, including cooked and dry cured Spanish ham, smoked salmon, minced meat and soft cheese.

Several parameters such as protein¹, fat², water³, nitrate and nitrite content⁴ as well as free amino acids⁵, produced by the radiolysis effect, were determined in both non irradiated and irradiated samples at doses up to 8 kGy employing official and/or validated analytical methods. The data obtained were evaluated by means of analysis of variance (ANOVA). The one-way ANOVA test showed that, in the most cases, there were statistically significant differences between the parameters studied from one level of radiation to another at 95.0% confidence level.

Because of the radiation effect on food composition was different depending on food nature, principal component analysis (PCA) was applied. This technique showed correlations between experimental results obtained as well as some relationships between the studied parameters. In all cases, the two first principal components (PCs) described more than 70.63% of the total data variance. The plots of the second PC versus the first one showed that protein and fat content were the parameters most affected at high level irradiation doses in all the studied foods. On the other hand, changes in composition were observed in minced meat and in soft cheese at irradiation levels higher than 6 kGy while for the other RTE foods, these changes were observed from 2 kGy radiation dose.

¹ AOAC Official Method 981.10

² Dionex Technical Note no. 334, no. 345 (accelerate solvent extraction, gravimetric method)

³ AOAC Official Method 930.15

⁴ AOAC Official Method 973.31 and 993.03, ISO 14673-1:2004

⁵ HPLC-UV method (C₁₈ column, isocratic separation with methanol - 20 mM pH 6 ammonium acetate buffer (6:94 v/v), 260 nm)

28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CHROMATOGRAPHY (Valencia, España 2010)



ISC
2010
September 12-16, 2010
28th International Symposium
on Chromatography
Valencia Conference Centre, Spain

**BOOK OF
ABSTRACTS**
www.isc2010.eu

SECYTA
GENERALITAT VALENCIANA
MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACION

P11-002 OPTIMIZATION OF DIRECT CHIRAL LC FOR ENANTIOMERIC SEPARATION OF ARYLPHENOXYPROPIONIC AND SAFENER HERBICIDES USING EXPERIMENTAL DESIGN METHODOLOGIES
Magro-Moral J., Guillén-Castaño V., Rosales-González N., Pérez-Arribas L.X., León-González M.E., Polo-Díaz L.M.
Complutense University of Madrid
Corresponding author e-mail: rosalesn@quim.ucm.es

Nowadays, about 25% of the pesticides used in agriculture industry are chiral compounds, which are produced and applied as racemates. Pesticide enantiomers frequently exhibit different bioactivity, toxicity and environmental behaviours. Therefore, to reduce the amount of manufactured agrochemicals and to prevent unnecessary enantiomer use causing adverse impact, only the active isomer should be employed.

Arylphenoxypropionic acids (ArPPs) are a new class of herbicides widely used as esters for selective removal of most grass species from any nongrass crop. They are often applied together with safener herbicides to improve selectivity and to protect crop plants from herbicide damage. Some of them present chirality, the R-enantiomer showing greater herbicidal activity. Consequently, development of enantioselective analytical methods is of great interest for stereochemical purity evaluation. Direct chiral separation of ArPPs has been mainly performed using stationary phases such as phenylcarbamates and esters of cellulose, Pirkle-type and cyclodextrins. In this work, LC-UV methods have been developed for enantiomeric separation of two ArPPs [fluzilop-(R,S)-butyl and quizalotop-(R,S)-ethyl] and a safener herbicide [metolpyr-(R,S)-diethyl], using a 1-acid glycoprotein chiral column (AGR, 100 x 3.0 mm). Detection wavelength was set at 290 nm for fluzilop-butyl and quizalotop-ethyl and 307 nm for metolpyr-diethyl. Flow rate was maintained at 0.8 mL min⁻¹ during the chromatographic run.

Multifactorial experimental designs were done to optimize the mobile phase composition for the direct chiral separation. Experimental factors and ranges selected were propanol (5-10%), pH of 10 mM phosphate buffer (6.5-7.0) and temperature (15-25 °C). Responses were expressed in terms of enantioresolution (Rs), enantioselectivity (α) and adjusted retention time (tr*) of the second eluted enantiomer. Mathematical models with R²>0.901 and standard error of estimation between 0.005-0.480 were obtained. Enantioresolution was significantly affected by 2-propanol percentage in all cases. Temperature affected significantly Rs of fluzilop-butyl while buffer pH only affected significantly Rs of quizalotop-ethyl enantiomers. Similar effects were observed for α values. Regarding tr*, temperature and 2-propanol had a significant influence for all compounds.

Multiple response analyses were carried out to determine the combination of experimental factors which simultaneously optimize Rs (≥1.0), α (≥1.1) and tr* (minimum value). As a compromise, following mobile phase compositions and temperatures were selected: 2-propanol/10 mM phosphate buffer pH 7.0 (7:93 v/v) at 17 °C for fluzilop-butyl; 2-propanol/10 mM phosphate buffer pH 7.0 (5:95 v/v) at 20 °C for quizalotop-ethyl; and 2-propanol/10 mM phosphate buffer pH 6.5 (0:100 v/v) at 15 °C for metolpyr-diethyl. Under these conditions, Rs between 0.8-1.3, α in the range 1.3-1.5 and tr* between 8-22 min were expected and experimentally assessed.

Analytical characteristics such as detection (LOD) and quantification (LOQ) limits, linearity range and precision (% RSD) were established. LODs were in the range 0.020-0.060 mg mL⁻¹. Good linearity was observed between 0.125 and 40 mg mL⁻¹ with R²>0.995. Run-to-run (n=5) and day-to-day precision (N=15), estimated for tr* and Rs, were < 5.7 % and < 4.8 % respectively.

36TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE SEPARATIONS AND RELATED TECHNIQUES (Budapest, Hungría 2011)



36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

Budapest Congress and World Trade Center Hungary
19-23 June 2011

19 Sun		
20 Mon		
21 Tue		
22 Wed		
23 Thu		




Final Programme

P1-G-164-TU

Determination of Serotonin and its Precursors by Capillary LC-MS.
Application to Chocolate Samples

Vanessa Guillén-Casta, Noelia Rosales-Conrado, María Eugenia de León-González,
Luis Vicente Pérez-Arribas, Luis María Polo-Diez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid,
E-28040 Madrid, Spain

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter in the central nervous system (CNS) which is synthesised from the L-tryptophan amino acid through short a metabolic pathway involving 5-hydroxytryptophan (5-HTP) as an intermediate. Serotonin has a broad activity in human brain, playing an important role in the modulation of anger, aggression, body temperature, mood, sleep, sexuality, appetite, and metabolism, as well as stimulating vomiting.

Chocolate is a mixture of cocoa paste, cocoa butter, and sugar having well known nutritional qualities; it also contains tryptophan, an essential amino acid which initiate the production of the serotonin. Moreover, although serotonin could be found only in small amounts, it plays an important role during certain nervous or depression states. Consequently, detection of serotonin and its precursors, L-tryptophan and 5-HTP, in chocolate samples is particularly important because they can be altered during cocoa processing.

Since concentration of these compounds is normally in the low $\mu\text{g g}^{-1}$ range, sensitive and selective analytical methods have to be applied for their determination. In the last few years, miniaturized LC has received special attention, offering the possibility to achieve good resolution and high efficiency in a short analysis time using small volumes of both samples and reagents.

The aim of the present study was to develop and optimize a capillary liquid chromatography cLC-MS method and a sample preparation procedure for the determination of serotonin and its precursors in commercial chocolate samples. Using a Zorbax SB-C18 column (150 x 0.5 mm I.D., 5 μm) a personalized multifactorial experimental design was applied to optimize pH and buffer concentration of the mobile phase, injection volume and focusing conditions. Best results were obtained by gradient elution at 20 $\mu\text{L min}^{-1}$, using a mixture of ACN/ammonium formate 5 mM pH 4 (3:97 v/v) as mobile phase. The injection volume was set at 10 μL and pure water was used as injection solution. Working in selected ion mode (m/z 177 for 5-HT, m/z 205 for L-tryptophan and m/z 221 for 5-HTP) detection limits were between 0.06 and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Linearity was in the concentration range 0.25–500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Intra- and inter-day precision for the whole cLC-MS system, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 0.10 and 6.0%.



36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques
Budapest Congress and World Trade Center
19-23 June 2011 - Budapest, Hungary

POSTER SESSION 1

